

Über die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin durch Enzym und Lipid

Brigitte Walther

Frankfurt/M 1964

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie der Universität Frankfurt am Main

(Direktor : Prof. Dr. Erich Heinz)

ÜBER DIE UMWANDLUNG VON PROTHROMBIN IN THROMBIN DURCH
ENZYM UND LIPID (+)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt (Main)

vorgelegt von
Brigitte Walther
aus Bad Homburg

Frankfurt (Main) 1964

(+) ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Dekan : Prof. Dr. med. J. Frey
Referent : Prof. Dr. med. L. Róka
Korreferent : Prof. Dr. med. K. Wezler
Mündliche Prüfung : 30. Januar 1964



Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung	1
B. Experimenteller Teil	
I. Methodik	
a.) Präparate	4
b.) Standardansätze und Meßmethode	6
II. Ergebnisse	
a.) Umwandlung von Prothrombin in Thrombin durch Trypsin und andere Proteasen	
1.) Rolle der Calciumionen	7
2.) Rolle der Trypsinkonzentration	8
3.) Rolle der Prothrombinkonzentration	11
4.) Rolle der Temperatur	11
5.) Einfluß von Lipid	12
6.) Hemmung der Trypsinwirkung	15
7.) Alpha- und beta-Thrombin	17
8.) Ersatz von Thrombokinaselipid durch andere Lipide	22
9.) Ersatz von Trypsin durch Schlangengifte	28
10.) Ersatz von Trypsin durch Lysolecithin	30
11.) Einfluß von Aldehydreagentien	31
b.) Ersatz von Trypsin durch Plasma und Serum	
1.) Allgemeines	33
2.) Einfluß von pH und Temperatur	34
3.) Abhängigkeit der Reaktion von der Substrat- und Enzymkonzentration	35
4.) Vorinkubation mit Serum	36
5.) Zusammenfassung	37

c.) Thrombokinasferment

1.) Herstellung	38
2.) Allgemeine Eigenschaften	39
3.) Einfluß der Fermentkonzentration	40
4.) Einfluß der Temperatur und einer längeren Vorinkubation	42
5.) Hemmstoffe	45
6.) Zusammenfassung	45

d.) Zwischenprodukt

1.) Seine Stellung im Verlauf der Um- wandlung des Prothrombins in Thrombin	48
2.) Abhängigkeit der Reaktion von der Lipidkonzentration	48
3.) Rolle der Calciumionen	49
4.) Einfluß der Temperatur	50
5.) Temperatur- und pH-Empfindlichkeit des Zwischenproduktes, Zusammenfas- sung	51

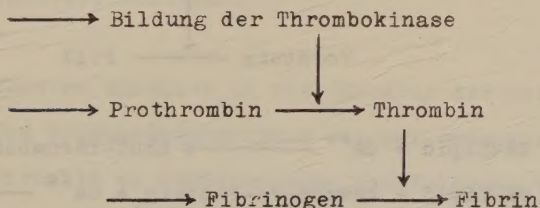
C. Zusammenfassung

54

D. Literaturverzeichnis

A.) Einleitung

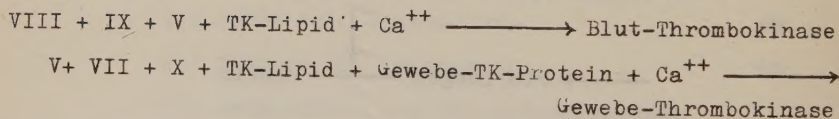
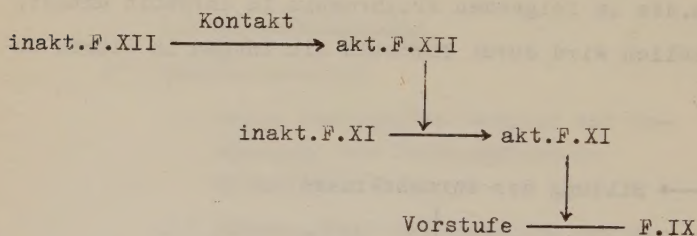
Tritt das Blut aus den Blutgefäßen, so gerinnt es. Dieser spontane Übergang einer Suspension in ein Gel ist bereits von MORAWITZ so weit analysiert worden, daß der dabei zugrunde liegende Vorgang als drei aufeinander folgende Reaktionsschritte erkannt wurde. Zunächst wird ein Aktivator, die Thrombokinasen, wirksam, die im folgenden Prothrombin in Thrombin umbaut, und schließlich wird durch Thrombin Fibrinogen in Fibrin umgewandelt.



In den letzten Jahren ist vor allem die Entstehung der Thrombokinasen sehr eingehend studiert worden. Dabei zeigte sich, daß die Thrombokinasen eine sehr schlecht charakterisierbare Komponente darstellt, die sich offenbar je nach der angewandten experimentellen Methode verschiedenartig verhält, so daß eine Reihe widersprechender Beschreibungen vorliegen.

Bald erwies sich die Thrombokinasen als stöchiometrisches Substrat, bald als katalytisches Enzym, bald als Protein, bald als Lipid, bald als hitzestabil, bald als hitzelabil. Die einen fanden sie im Gewebe, andere im Plasma und andere wiederum in den Thrombocyten.

Insbesondere läßt sich die Thrombokinase als Summe von Einzelkomponenten beschreiben, die als Vorstufe oder als Teilstücke der Thrombokinaseaktivität angesehen werden, ohne daß bisher geklärt ist, wie alle diese Faktoren zusammen die Aktivität ergeben. Das folgende Schema gibt eine der heutigen Ansichten über die Thrombokinasebildung wieder:



Da Thrombokinase die Komponente darstellt, die in der Lage ist, Prothrombin in Thrombin umzuwandeln, ist zu erwarten, daß man durch genaue Kenntnis über den chemischen Umbau des Prothrombinmolekuls bei seiner Umwandlung in Thrombin, die chemische Funktion der Thrombokinase genauer erfassen kann.

Bei der Analyse von weitgehend gereinigtem Prothrombin und Thrombin zeigte sich, daß beide Glykoproteide sind, sich aber im Aufbau unterscheiden. Thrombin ist das kleinere Molekül und trägt am Aminoende seiner Peptidkette einen Leucinrest, während das größere Prothrombinmolekül auf der Aminosäureseite der Peptidkette mit Alanin endet. Das Thrombinmolekül erscheint daher

als ein Teilstück des Prothrombinmoleküls, aus dem es offenbar durch eine Peptidspaltung entstanden ist. Die Wirkung der Thrombokinase sollte demnach auf einer proteolytischen Spaltung beruhen. Schon EAGLE hatte eine Reihe von Proteasen daraufhin untersucht und gefunden, daß Trypsin Prothrombin in Thrombin umwandelt. Trypsin ist also in der Lage, die Thrombokinase zu imitieren, obwohl Thrombokinase nicht mit Trypsin identisch sein kann, da es sich in seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften grundsätzlich von der Thrombokinase unterscheidet, insbesondere, weil alle wirksamen Thrombokinase-Präparate einen Lipidanteil besitzen.

Um näheren Einblick in die Struktur der Thrombokinase und in den Wirkungsmechanismus bei der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin zu erhalten, habe ich folgende Versuchsreihe durchgeführt:

Zunächst prüfte ich die Reaktion zwischen Prothrombin und Trypsin, anschließend untersuchte ich den Einfluß verschiedener Lipide auf die Reaktion, und schließlich habe ich das Trypsin durch die in Plasma und Serum enthaltene "Thrombokinase" ersetzt.

Über diese Versuche berichtet die vorliegende Arbeit.

B.) Experimenteller Teil.

I. Methodik.

a.) Präparate:

- 1.) Prothrombin (PTB) : Rinderoxalatplasma wird so oft asbestfiltriert, bis die Gerinnungszeiten für Thrombokinasen und die Faktoren V und VII länger als 200 sek. sind. Dieses Plasma wird in Anlehnung an die Methode 12 der Harvard-Gruppe folgendermaßen weiterverarbeitet: Adsorption an BaSO_4 (3%), das Sediment wird zweimal mit Aqua bidest., je einmal mit 0.9% NaCl und mit 0.1 n Na-oxalat gewaschen. Schließlich wird das Sediment zweimal mit 5%iger Na-citratlösung eluiert, die vereinigten Eluate über Nacht bei 4°C gegen bidest. Wasser dialysiert. Die dialysierte Lösung wird auf pH 6.0 gebracht, das ausfallende Begleiteiweiß verworfen. Bei Einstellung auf pH 4.6 fällt Prothrombin aus, das abzentrifugiert und bei pH 7.0 in Wasser gelöst wird. Nach dem Gefriertrocknen wird es auf seine Aktivität geprüft.
- 2.) Kristallisiertes Trypsin von Boehringer.
- 3.) Plasma: Rindercitratplasma wird gefriergetrocknet, mit Aceton und anschließend mit Chloroform extrahiert, in Aqua bidest. gelöst, an BaSO_4 adsorbiert und der Überstand verworfen.
- 4.) Serum: Humansammelserum wird nach Gefriertrocknen mit Aceton und anschließend mit Chloroform extrahiert und in Aqua bidest. gelöst.
- 5.) Ferment: Rinderoxalatplasma wird asbestfiltriert, an BaSO_4 adsorbiert (3%) und der Überstand für 30 Minuten auf 53°C erhitzt, um das Fibrinogen auszufällen. Der Überstand wird bei

pH 5.9 an Kaolin (5%) adsorbiert, das Sediment mit H_2O gewaschen und mit 0.1%igem Ammoniumcarbonat (pH 9.6) eluiert. Bei der anschließenden Dialyse gegen Wasser fällt das aktive Material aus. Der Niederschlag wird in 0.9%iger NaCl-Lösung aufgenommen, neutralisiert, gefriergetrocknet und auf seine Fermentaktivität sowie auf gerinnungsaktive Verunreinigungen geprüft.

6.) Thrombokinase-Lipid (TKL) : Frisches Humanhirn wird von seinen Hüllen und Gefäßen befreit, im Multimix zerkleinert und so lange mit Aceton gewaschen, bis ein feinkörniges Pulver entstanden ist. Dieses Pulver wird mit Chloroform extrahiert, das Unlösliche verworfen und der klare Überstand mit dem zehnfachen Volumen an Aceton versetzt. Dabei fällt das Thrombokinase-Lipid aus. Der Überstand wird verworfen und das Sediment im Vakuum getrocknet. Das Lipid läßt sich durch Homogenisieren leicht in Wasser suspendieren.

7.) Calcium: 54mM Lösung von $CaCl_2$ in Aqua bidest.

8.) Puffer: 0.1 M Veronalpuffer, pH 7.6

9.) Fibrinogen: Rinderfibrinogen der Behring-Werke in 300 mg%iger Lösung. 0.1 ml pro Vorlagenröhrchen.

10.) Vorlageplasma: Rinderoxalatplasma wird asbestfiltriert und an $BaSO_4$ adsorbiert. Der Überstand wird verwandt. Er muß für Prothrombin, Thrombin, Thrombokinase und die Faktoren V und VII Gerinnungszeiten haben, die länger sind als 200 sek.

b.) Standardansätze und Messmethode:

PTB	0.5ml	PTB	0.5ml	PTB	0.5ml
Trypsin	0.5ml	Plasma	0.5ml	Ferment	0.5ml
Lipid	0.5ml	Serum	0.5ml	Lipid	0.5ml
1.) CaCl_2	0.5ml	2.) Lipid	0.5ml	3.) CaCl_2	0.5ml
Puffer	0.2ml	CaCl_2	0.5ml	Puffer	0.2ml
H_2O ad	3.0ml	Puffer	0.2ml	H_2O ad	3.0ml
		H_2O ad	3.0ml		

Die Bildung von Thrombin aus Prothrombin wird in allen Ansätzen durch die Zugabe von CaCl_2 gestartet. Die Endkonzentration der Calciumionen beträgt dann 9 mM/l. Als Standardbedingung wurde eine Inkubationstemperatur von 37°C gewählt. Nach den angegebenen Inkubationszeiten werden 0.2ml entnommen und zu 0.1ml Fibrinogen bzw. 0.1ml Vorlageplasma zugegeben. Gleichzeitig wird eine Stoppuhr in Gang gesetzt und das Auftreten eines sichtbaren Gerinnsels als Gerinnungszeit gestoppt.

II. Ergebnisse.

a.) Umwandlung von Prothrombin in Thrombin durch Trypsin und andere Proteasen.

1.) Rolle der Calciumionen:

Trypsin spaltet Prothrombin nur, wenn der Reaktionsansatz Calciumionen enthält. Als Spaltprodukt des Prothrombins lässt sich Thrombin nachweisen. Ohne Calcium ist Prothrombin in Gegenwart von Trypsin stabil. Bei konstanter Prothrombin- und Trypsinkonzentration ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Thrombinausbeute von der Calciumkonzentration bis zu einem Maximum von 9 mM/l als Endkonzentration. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Ausbeute an Thrombin wieder ab. (Abb. 1)

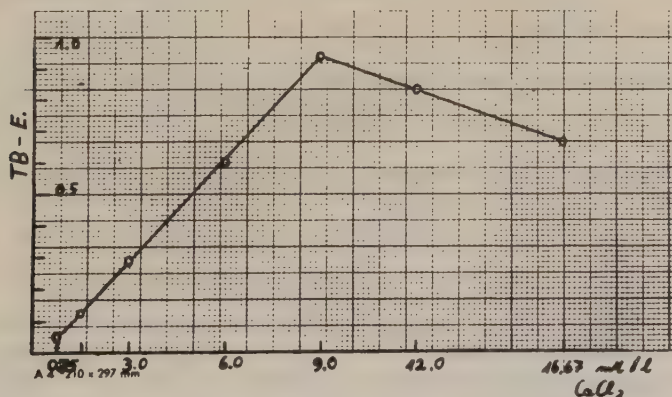


Abb. 1 Optimale Calciumchloridkonzentration.

Der Trypsineffekt lässt sich zu jedem Zeitpunkt der Reaktion durch Beseitigung der Calciumionen blockieren. (Abb. 2)

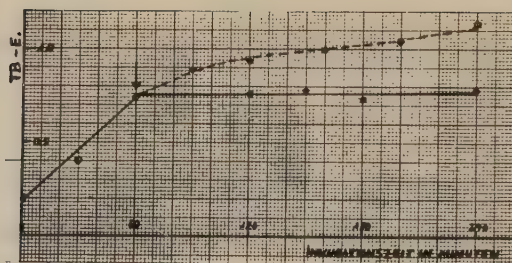


Abb.2 Hemmung des Trypsineffektes durch Zusatz von Natriumoxalat 60 Min. nach Reaktionsbeginn.

Als Erklärung für diesen Befund bieten sich verschiedene Möglichkeiten an: entweder aktivieren die Calciumionen das Trypsin, oder sie verändern die Struktur des Prothrombinmoleküles so, daß seine Spaltbarkeit durch Trypsin erleichtert wird. Auch die Möglichkeit, daß das Calcium eine Inaktivierung des Trypsin durch ein Reaktionsprodukt verhindert, läßt sich auf Grund der relativ langsamen Reaktionsgeschwindigkeit und geringen Ausbeute an Thrombin nicht ausschließen.

2.) Rolle der Trypsinkonzentration:

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist eine Funktion der Trypsinkonzentration. (Abb.3)

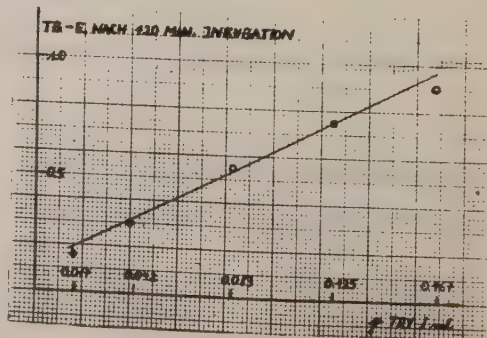


Abb.3

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Trypsinkonzentration.

Aber nur bei einem Überschuß an Trypsin wird alles Prothrombin in Thrombin umgewandelt. Bei geringeren Konzentrationen ist die prozentuale Thrombinausbeute direkt proportional der Trypsinkonzentration. (Abb.4)

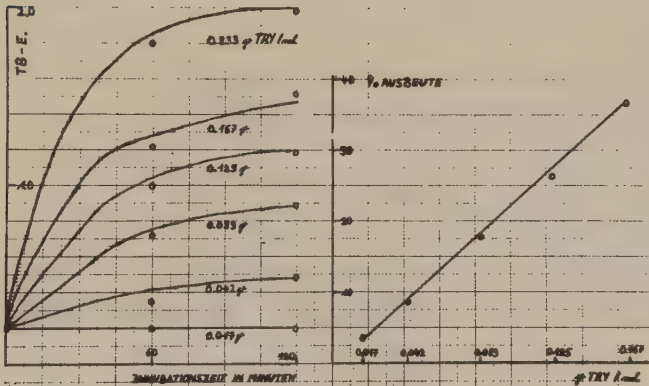


Abb.4 Abhängigkeit der Thrombinausbeute von der Trypsinkonzentration.

Aus dem asymptotischen Verlauf der Kurven sieht man, daß sich die spaltende Fähigkeit des Trypsin erschöpft, denn es steht ja noch genügend Prothrombin zur Verfügung. Dies bedeutet: Trypsin wirkt nicht katalytisch, sondern beteiligt sich stöchiometrisch an der Reaktion, ohne daß damit gesagt ist, ob es dabei inaktiviert oder an einen Reaktionsteilnehmer gebunden wird.

Läßt man die Spaltung bei einer bestimmten Trypsinkonzentration zu Ende laufen und gibt dann erneut dieselbe Trypsinmen-

ge zum Reaktionsansatz, so steigt die Thrombinbildungskurve mit derselben Steigung wie vorher auf ein höheres Niveau an. (Abb.5)

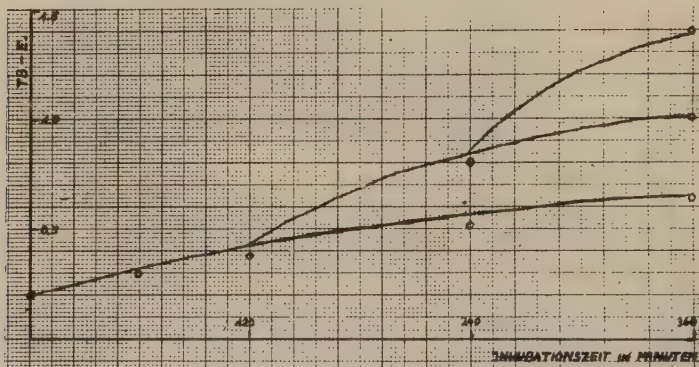


Abb.5 Nachträglicher Trypsinzusatz nach 120 bzw.240 Min.
Die Konzentration des Trypsinzusatzes ist jeweils die gleiche: 0.0167 y/ml

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist also für jede Trypsinkonzentration charakteristisch, und es ergibt sich kein Summationseffekt. Daraus kann man schließen, daß bei Reaktionsbeginn das gesamte zur Verfügung stehende Trypsin in die Reaktion eintritt und so viel des vorhandenen Prothrombins spaltet, bis die anfängliche Trypsinmenge verbraucht ist. Jeder weitere Trypsinzusatz bedeutet einen neuen Beginn der Reaktion auf dem Niveau der ersten Spaltung.

3.) Rolle der Prothrombinkonzentration:

Hält man Trypsin konstant und variiert Prothrombin, so ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Thrombinausbeute von der eingesetzten Prothrombinmenge. Für verschiedene Trypsinkonzentrationen erhält man eine Kurvenschar, deren Steigungen von der jeweiligen Trypsinmenge bestimmt werden. Für eine definierte Thrombinausbeute verhalten sich Prothrombin und Trypsin entsprechend einer Exponentialfunktion mit negativem Exponenten. (Abb.6)

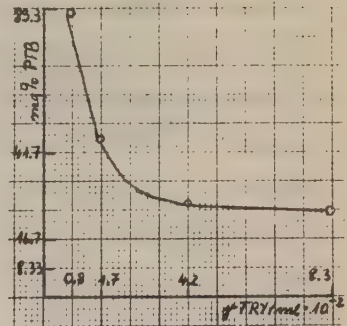
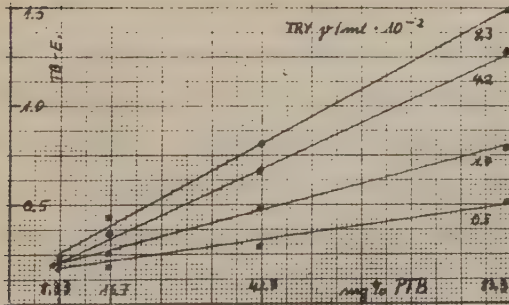


Abb.6 Verhältnis von Prothrombin und Trypsin bei bestimmter Thrombinausbeute.

4.) Rolle der Temperatur:

Ausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit steigen bis zu einer Inkubationstemperatur von 20°C linear an. Weitere Temperatursteigerungen erhöhen weder die Ausbeute noch die Reaktionsgeschwindigkeit:

Inkubationstemp.	0°	10°	20°	37°
Ausbeute in TB-E. nach 120 Minuten	0.98	1.15	1.30	0.90

5.) Einfluß von Lipid:

Wie Abbildung 4 zeigt, können nur verhältnismäßig große Mengen Trypsin alles zur Verfügung stehende Prothrombin spalten, kleine Trypsinmengen sind rasch erschöpft. Da bei der Thrombokinase das Lipid eine wichtige Rolle spielt und die in der ausgedehnten Literatur mitgeteilten Befunde zeigen, daß ohne Lipid keine oder nur eine sehr geringe Thrombokinasebildung erkennbar ist, interessierten wir uns dafür, ob die Lipidkomponente der Thrombokinase einen Einfluß auf die Reaktion Trypsin plus Prothrombin besitzt. Wir haben daher den Umbau von Prothrombin in Thrombin durch Trypsin in Gegenwart von Thrombokinaselipid (= Thrombocytenfaktor 3) untersucht. Das Thrombokinaselipid stellten wir aus Humanhirn her; es zeigt sich relativ säure- und laugenbeständig und wirkt nur in Gegenwart von Calciumionen in einem breiteren pH-Bereich als Trypsin. Ohne Trypsin bleibt Prothrombin, mit Lipid und Calcium inkubiert, unverändert, während die Ausbeute an Thrombin und die Reaktionsgeschwindigkeit beträchtlich erhöht werden, wenn man zu Prothrombin, Trypsin und Calcium noch Lipid zusetzt. (Abb. 7a und 7b)

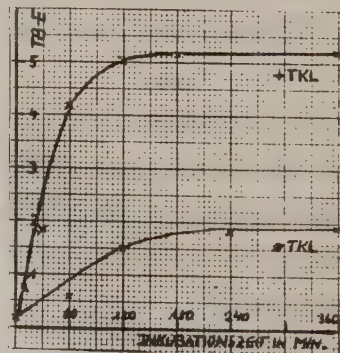
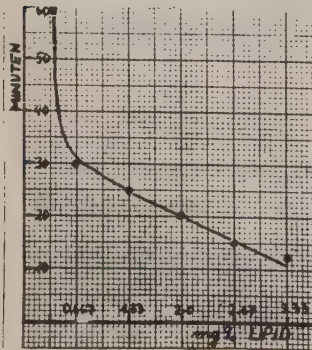


Abb. 7a und 7b: Effekt des Thrombokinaselipid und die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion seiner Konzentration.

ur gleiche Prothrombin- und Trypsinkonzentration ist die Thrombinausbeute von der Thrombokinaselipid-Konzentration im Bereich von 0.33 mg% bis 3.33 mg% als Enkonzentration linear abhängig. Bei höheren Lipidmengen laufen die Kurven asymptotisch weiter, jedoch richtet sich die Thrombinausbeute auch bei Lipidüberschuß nach der verfügbaren Menge Trypsin. (Abb.8)

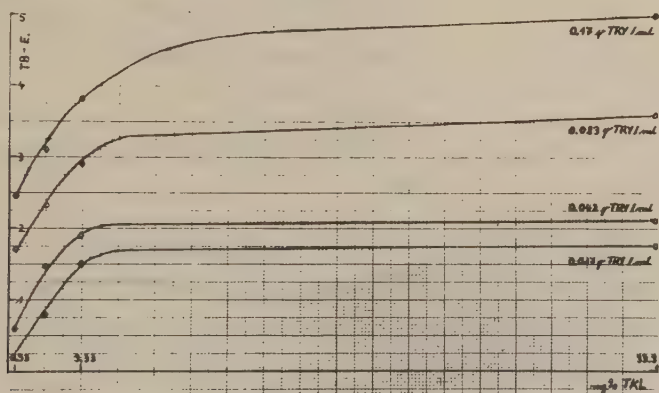
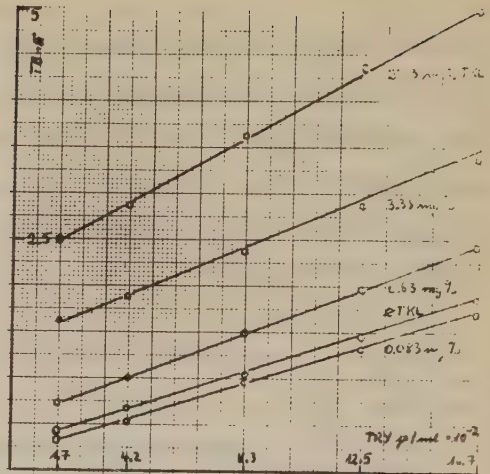


Abb.8 Thrombinausbeute als Funktion der Thrombokinaselipid-Konzentration bei verschiedenen Trypsinkonzentrationen.

Dieselbe Abhängigkeit der Thrombinausbeute von der eingesetzten Trypsinmenge beobachtet man ohne Lipid und bei suboptimalen Lipidmengen. Lediglich die absolute Thrombinausbeute ist verschieden. Abbildung 9 zeigt, daß die Thrombinausbeute jeweils um rund 1.75 E ansteigt, wenn die Trypsinmenge von 0.017 y/ml auf 0.17 y/ml vergrößert wird, gleichgültig ob die Thrombinausbeute mit 0.017 y/ml bei 0.4 E ohne Lipid oder bei 2.5 E mit 33 mg% Lipid lag. (Abb.9)

Abb.9
Abhängigkeit der Thrombin-
ausbeute von der Trypsin-
konzentration bei ver-
schiedenen Lipidkonzentra-
tionen.



Besonders deutlich läßt sich die Lipidwirkung erkennen, wenn das Lipid erst zugesetzt wird, nachdem Prothrombin, Trypsin und Calcium bereits längere Zeit aufeinander eingewirkt haben. (Abb.10)

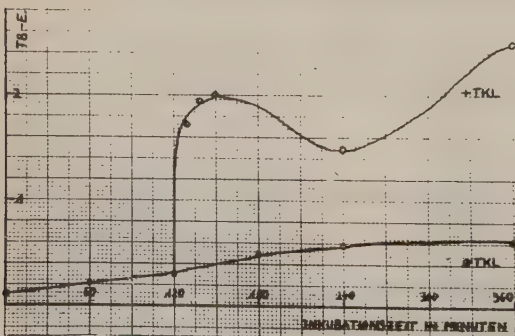


Abb.10
Zusatz von TK-Lipid zwei
Stunden nach reaktions-
beginn.

Die Befunde, daß Lipid ohne Trypsin wertlos ist und die Thrombinausbeute mit und ohne Lipid von Trypsin abhängig bleibt, daß Lipid sofort Thrombin liefert, wenn zunächst Prothrombin und Trypsin miteinander reagiert hatten, erlaubt die Folgerung, daß zwei Reaktionsschritte nacheinander ablaufen: Zunächst

führt Trypsin das Prothrombin in ein Reaktionsprodukt über, mit welchem in einem zweiten Schritt das Lipid reagiert, wobei sofort Thrombin entsteht.

6.) Hemmung der Trypsinwirkung:

Zur Prüfung dieser Hypothese versuchte ich, beide Reaktionen voneinander abzutrennen, indem ich die Trypsinwirkung hemmte

- 1.) durch Verschieben des pH ,
- 2.) durch Zugabe von Sojabohnentrypsininhibitor (SBI),
- 3.) durch Zugabe des Kallikreinaktivators Trasylol.

Bei pH 6 spaltet Trypsin Prothrombin nicht, aber die Thrombokinase-Lipid-Wirkung läuft noch ungehindert ab. (Abb.11)

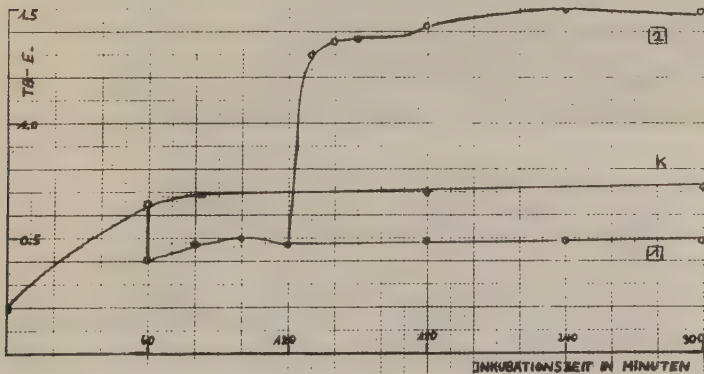


Abb.11 Effekt einer pH-Verschiebung in den sauren Bereich auf die Trypsin- und Lipidwirkung.
 Ansatz K: Prothrombin + Trypsin, pH 7.8
 Ansatz 1: Nach 60 Min. Verschieben des pH auf 6.0 Ansatz 2: Wie Ansatz 1, nach 120 Min.
 Zusatz von Thrombokinase-Lipid (3.33 mg%)

Blockiert man im aufsteigenden Ast der Thrombinbildungskurve das Trypsin durch Sojabohnentrypsininhibitor SBI, so steigt die Thrombinausbeute nicht weiter an. Wird zusammen mit SBI

das Lipid zugegeben, so wird zwar plötzlich Thrombin gebildet, jedoch bleibt die Thrombinausbeute geringer als in einem Kontrollansatz ohne SBI. (Abb.12a)

Wird Trypsin nach 90 Minuten durch Trasylol gehemmt, so unterbleibt eine weitere Thrombinbildung völlig. Gleichzeitig zugesetztes Lipid läßt Thrombin normal rasch und in voller Ausbeute entstehen. (Abb.12b)

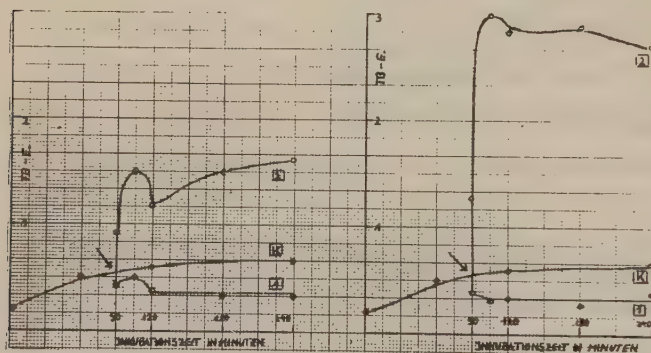


Abb.12a Hemmung durch SBI. Ansatz K: Prothrombin + Trypsin. Ansätze 1 u. 2: nach 90 Min. Zugabe von 0.5 ml SBI (41.3 y%) und in Ansatz 2 außerdem 0.5 ml TK-Lipid (3.33 mg%)

Abb.12b Hemmung durch Trasylol. Ansatz K: Prothrombin + Trypsin. Ansätze 1 u. 2: nach 90 Min. Zugabe von 0.5 ml Trasylol (0.41%) und zu Ansatz 2 noch 0.5 ml TK-Lipid (3.33 mg% als Endkonzentration)

Erfolgen Trypsinhemmung und Lipidzusatz nicht gleichzeitig, so hat die Zeitspanne zwischen Trypsinhemmung und Lipidzusatz keinen Einfluß auf die durch das Lipid verursachte Thrombinbildung.

Wird der Hemmstoff SBI gleich zu Reaktionsbeginn zugesetzt, so kann Trypsin nicht wirken. Infolgedessen bleibt später zugege-

benes Lipid ohne Effekt, und es entsteht kein Thrombin.

Trasylol, zu Beginn der Reaktion zugegeben, unterdrückt die Trypsinwirkung, es läßt sich also in einem Ansatz mit Prothrombin, Trypsin, Calcium und Trasylol keine Thrombinaktivität messen.

Wird aber später Lipid zugesetzt, so entsteht nach einer Latenzzeit von 20 Minuten Thrombin, dessen Bildung so langsam ist wie bei gemeinsamer Gabe von Trypsin und Lipid bei Reaktionsstart.

(Abb.13)

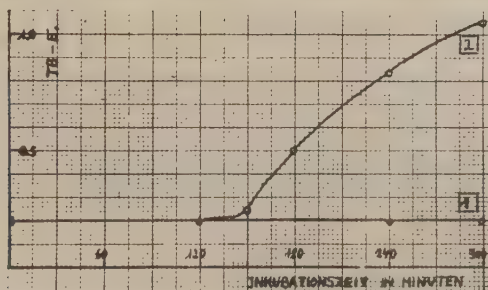


Abb.13 Start der Reaktion mit Trasylol. Ansatz 1: Prothrombin + Trypsin + Trasylol. Ansatz 2 entsprechend, nach 120 Min. Zusatz von TK-Lipid (3.33 mg%)

Es sieht so aus, als ob das Lipid in der Lage ist, die Trasylol-Hemmung aufzuheben, nicht dagegen die SBI-Hemmung. Die Trypsin-Inhibitor-Komplexe sind offenbar verschieden fest.

7.) alpha- und beta-Thrombin:

Bei nachträglicher Lipidzugabe beobachtet man, daß Thrombin regelmäßig in zwei Gipfeln entsteht. Sofort nach Lipidzugabe steigt die Thrombinaktivität steil auf ein Maximum an, fällt nach wenigen Minuten wieder ab, um dann erneut anzusteigen und

zwar in der Regel etwa auf dasselbe Niveau wie während der Sofortreaktion.

Die folgenden Versuche zeigen, daß die beiden Aktivitätsgipfel d.h. die beiden Reaktionsabläufe verschiedenartig beeinflußt werden können. Daraus läßt sich schließen, daß es sich um zwei verschiedene Thrombine handelt. Unter Standardbedingungen wird zunächst ein Thrombin gebildet, das offenbar rasch wieder in eine inaktive Form übergeht. Danach entsteht etwas verzögert ein zweites stabileres Thrombin. In Anlehnung an die Bezeichnung bei Chymotrypsin unterscheide ich die beiden Thrombinformen als alpha- und beta-Thrombin.

Der gemeinsame Aktivitätsverlauf läßt sich in zwei sich überdeckende Kurven auflösen. (Abb.14)

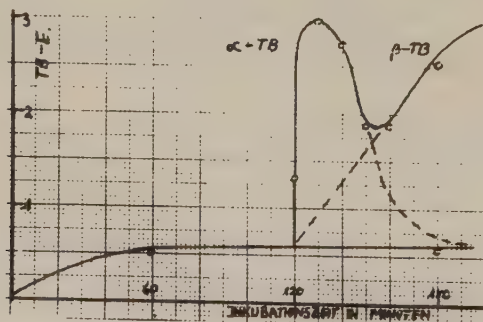


Abb.14 Aktivitätsverlauf von alpha- und beta-Thrombin.

Ein zweiter Lipidzusatz im Verlauf des alpha-Gipfels bleibt ohne Effekt. Wird jedoch erneut Thrombokinaselipid im Verlauf des zweiten, langsameren Anstieges zugesetzt, so steigt die Thrombinausbeute wieder steil an. (Abb.15)

Da schon beim ersten Male Lipid in optimaler Konzentration

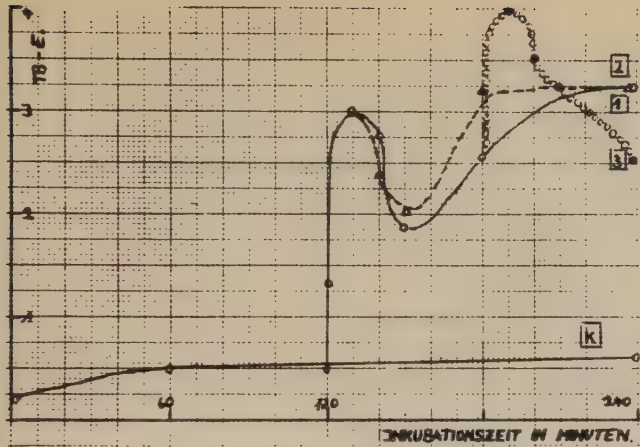
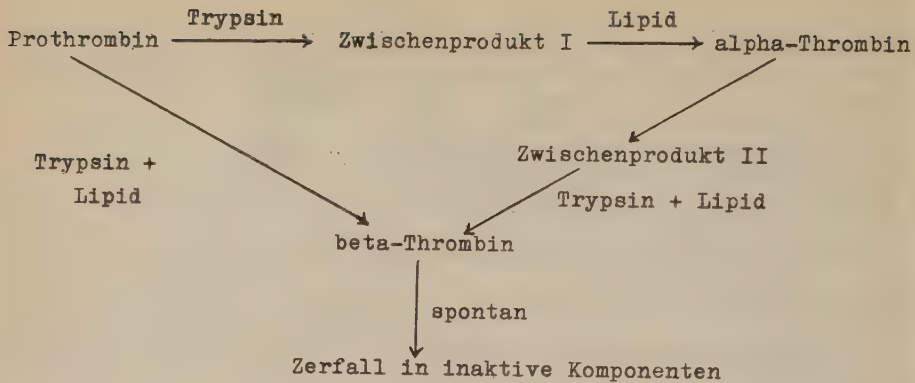


Abb.15 Ansatz K: Standardansatz mit PTB und Trypsin ohne Lipid.
 Ansatz 1: Standardansatz mit PTB und Trypsin, Lipidzugabe nach 120 Min. mit Endkonz. 33.3 mg%. Ansatz 2: Wie Ansatz 1 nur 0.5 ml H_2O weniger, dafür nach 130 Min. nochmals Zusatz von Lipid in Endkonz. 33.3 mg%. Bei Ansatz 3 erfolgt der zweite Lipidzusatz erst nach 180 Min.

zugesetzt war, läßt sich aus diesem Befund schließen, daß Prothrombin mit Trypsin rasch zu Zwischenprodukt I umgewandelt wird, und dieses reagiert mit Lipid zu alpha-Thrombin. Dabei wird der Hauptanteil von Lipid verbraucht. Alpha-Thrombin ist instabil und geht spontan in ein Thrombin-inaktives Produkt über, aus dem Trypsin zusammen mit Lipid langsam beta-Thrombin freisetzt. Da für die Bildung von alpha-Thrombin der Hauptanteil an Lipid verbraucht ist, kann ein erneuter Lipidzusatz die Ausbeute an beta-Thrombin deutlich steigern. Auch beta-Thrombin ist unter Standardbedingungen nicht stabil. (Siehe Schema S.20)

Zu dieser Hypothese habe ich folgenden Versuch gemacht:

Kontrolle: 3 ml einer 500mg%igen Prothrombinlösung wurden gefriergetrocknet, wieder gelöst und mit Trypsin geprüft. Es er-



gaben sich die üblichen Thrombinbildungskurven.

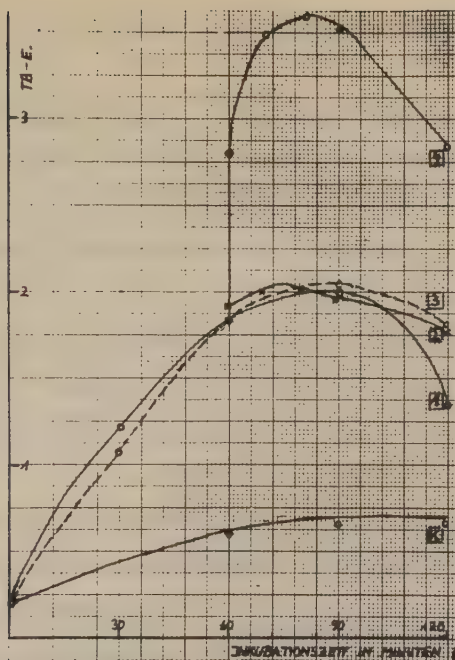
Versuchsansatz: 5 ml einer 500mg%igen Prothrombinlösung wurden mit 5 ml einer 200mg%igen Thrombokinaselipidlösung bei 14°C für 45 Minuten inkubiert, gefriergetrocknet, das Trockenpulver in vier gleiche Teile geteilt und diese geprüft:

1. mit Trypsin und Calcium ohne Thrombokinaselipid.
2. mit Trypsin und Calcium, nach 60 Minuten Zugabe von Thrombokinaselipid (Endkonzentration 33.3mg%)

Die zweite Hälfte wurde als Trockenpulver mit Chloroform extrahiert, getrocknet und wieder gelöst:

3. mit Trypsin und Calcium ohne Lipid,
4. mit Trypsin und Calcium, nach 60 Minuten Zugabe von Lipid wie Ansatz 2 .

Zur Kontrolle wurde je eine Probe des vorbehandelten Prothrombins mit allen Faktoren in der Zweiphasenmethode auf ihre Prothrombinaktivität geprüft, und es ergab sich kein Unterschied gegenüber unbehandeltem Prothrombin. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Ansätze 1 bis 4 .



A bb.16

Die Thrombinausbeute in Ansatz 1 ,aus dem das Lipid nicht durch Chloroform entfernt, ist steigt auf Trypsinzusatz mit einer Anstiegsgeschwindigkeit von 1 TB-E./30 Min. bis ein Maximum von 2 TB-E. erreicht ist und fällt dann wieder ab. Ein weiterer Lipidzusatz (Ansatz 2) hat keinen Erfolg mehr, die Thrombinbildungskurve verläuft parallel zu der des Ansatz 1. Aus Ansatz 3 wurde das Inkubationslipid durch Chloroform entfernt. Mit Trypsin entspricht die Thrombinbildung der der Ansätze 1 und 2 ,nicht etwa der eines Ansatzes, in dem nie Lipid vorhanden war. In Ansatz 4 ,der sich von 3 ja nur dadurch unterscheidet, daß nach 60 Minuten nochmals Lipid zugefügt wird, steigt die Kurve der Thrombinbildung in der für verspäteten Lipidzusatz typischen zweiphasischen Weise an. Ein Kontrollan-

satz, der nur Prothrombin, Calcium und Lipid enthält, zeigt keine Thrombinaktivität.

Dieser Befund ordnet sich recht gut in das Schema von Seite 20 ein: Durch Vorinkubation von Prothrombin mit Lipid zwingt ich die Reaktion gewissermaßen in Richtung auf beta-Thrombin, d.h. zugesetztes Trypsin verwandelt das Prothrombin-Lipidgemisch langsam zu beta-Thrombin. Extrahiert man aber das Prothrombin-Lipidgemisch mit Chloroform, dann kann man mit Trypsin wieder Zwischenprodukt I und durch Lipid alpha-Thrombin erhalten. Ein Teil des Lipids bleibt aber so fest an Prothrombin gebunden, daß daraus direkt beta-Thrombin entsteht.

Man kann also durch die Art der Vorinkubation die Reaktion in die eine oder andere Richtung lenken. Erfolgen Trypsin- und Lipidzusatz gleichzeitig, so wird die alpha-Thrombinstufe gewissermaßen übersprungen, es entsteht gleich beta-Thrombin.

Durch Vorinkubation mit Trypsin entsteht aus Prothrombin primär Zwischenprodukt I, während durch Inkubation des Prothrombin mit Lipid möglicherweise direkt Zwischenprodukt II gebildet wird.

8.) Ersatz von Thrombokinaselipid durch andere Lipide:

Als nächstes ergab sich die Frage, ob die Thrombinbildung aus Prothrombin und Trypsin durch Thrombokinaselipid spezifisch gefördert wird, oder ob andere Lipide ebenfalls in die Thrombinbildung eingreifen. Genau wie Acetontrockenpulver von Humanhirn extrahierte ich Acetontrockenpulver anderer Organe mit Chloroform (s. methodischer Teil). Diese Organlipide wurden anstelle von Hirnextrakt nach 120 Minuten dem Standardansatz zugesetzt.

1.) Organextrakte: Chloroformextrakte aus Lunge, Milz, Niere, Hoden (Ratte), Leber (Schwein) und Placenta (Mensch).

Aus der Herzmuskulatur der Ratte ließ sich kein Extrakt gewinnen. Die Chloroformextrakte aus Lunge, Milz, Niere, Hoden, Leber und Placenta wurden acetongefällt, im Vakuum getrocknet und in drei Konzentrationen geprüft. Außer der Placenta waren die Organe nicht blutfrei gespült. Für Lunge, Milz, Niere, Hoden und Leber ergeben sich die typischen Thrombinbildungskurven, deren alpha-Gipfel bei stärkerer Verdünnung zugunsten des beta-Gipfels abnimmt, wobei die absolute Thrombinausbeute mit abnehmender Konzentration sinkt:

		Thrombinausbeute in TB-Einheiten	
		alpha-Thrombin	beta-Thrombin
Lungenlipid bei	33.30 mg%	1.08	3.20
	3.33 mg%	1.06	2.85
	0.33 mg%	0.80	2.05
Milzlipid bei	33.30 mg%	1.80	4.42
	3.33 mg%	0.74	4.40
	0.33 mg%	fehlt	2.80
Nierenlipid bei	33.30 mg%	1.44	2.95
	3.33 mg%	1.10	2.60
	0.33 mg%	fehlt	2.40
Hodenlipid bei	33.30 mg%	1.20	2.85
	3.33 mg%	0.65	2.40
	0.33 mg%	fehlt	1.96
Lipid der Gesamt-placenta bei	33.30 mg%	0.54	1.16
	3.33 mg%	0.64	1.63
	0.33 mg%	1.43	1.77
Lipid der fetalen Seite bei	33.30 mg%	fehlt	1.25
	3.33 mg%	fehlt	1.85
	0.33 mg%	fehlt	2.38
Lipid der materalen Seite bei	33.30 mg%	0.77	1.53
	3.33 mg%	fehlt	1.29
	0.33 mg%	fehlt	1.07

Wie die Tabelle zeigt, ergeben sich bei den Placentapräparaten deutliche Unterschiede, je nachdem ob man die gesamte Placenta, die materne oder die fetale Seite als Ausgangsmaterial verwendet.

a.) Gesamtplacenta: Deutliche Zweigipfligkeit, Thrombinausbeute steigt mit abnehmender Konzentration in beiden Gipfeln, Maximum 30 Minuten nach Zusatz erreicht.

b.) Fetale Seite: Alpha-Thrombin fehlt vollständig, Thrombinausbeute steigt im beta-Gipfel mit abnehmender Konzentration, die gesamte Ausbeute ist etwa zweimal so hoch wie bei den Präparaten aus Gesamtplacenta oder aus der mäternen Seite. Maximum 60 Minuten nach Zusatz.

c.) Materne Seite: Alpha-Thrombin gerade eben angedeutet, die Ausbeute sinkt mit abnehmender Konzentration, Maximum 60 Minuten nach Zusatz. (Abb.17)

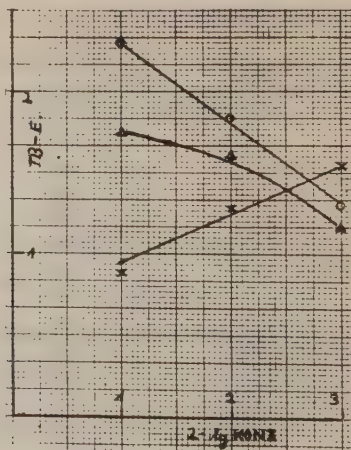


Abb.17
Extrakte aus der Placenta
Gesamtextrakt Δ—Δ
Fetale Seite ○—○
Materne Seite x—x

Die fetale Placenta enthält offenbar Hemmstoffe, die sich herausverdünnen lassen. Insgesamt ist diese aktiver als die mütterliche.

Seite und die Gesamtplacenta. In dem mütterlichen Anteil konnten wir keine Hemmstoffe nachweisen.

Außerdem prüften wir Chloroformextrakte aus den korpuskulären Bestandteilen des Blutes:

Aus nicht haemolysierten Erythrocyten ließ sich kein Extrakt gewinnen.

Chloroformextrakt aus acetongetrockneten Rinderthrombocyten zeigte sich äußerst aktiv. Die Aktivität war fast höher als die unseres üblichen Thrombokinaselipid-Präparates, und die alpha- und beta-Thrombinbildung war sehr ausgeprägt. Einen deutlichen Unterschied zeigten die Thrombocytenextrakte des Pferdes, die nur etwa 50% der Aktivität aufwiesen.

Myelocyten zeigten geringere Aktivität (60% der Thrombocytenaktivität) mit Betonung des beta-Thrombin, während die Leukocyten mit 50% der Thrombocytenaktivität eine deutliche alpha-Thrombinbildung zeigten. (Abb.18)

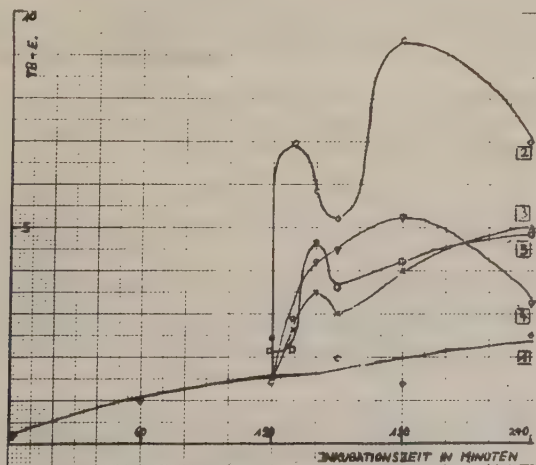


Abb.18 Chloroformextrakte aus den korpuskulären Bestandteilen des Blutes. Ansatz 1: PTB + Trypsin. Ansatz 2: Zusatz von Rinderthrombocytenlipid 120 min. nach Reaktionsstart. Ansatz 3: Pferdethrombocytenlipid. Ansatz 4: Myelocytenlipid. Ansatz 5: Leukocytenlipid.

An isolierten Lipiden prüfte ich Serin-Kephalin, Colamin und Lecithin (+). Sie zeigten bei gleicher Konzentration eine Abnahme des alpha-Thrombin-Gipfels von Serin-Kephalin über Colamin nach Lecithin, während bei allen drei Präparaten der beta-Gipfel ungefähr die gleiche Höhe aufweist, wenn auch die Reaktionsgeschwindigkeit in der gleichen Reihenfolge abnimmt. (Abb. 19)

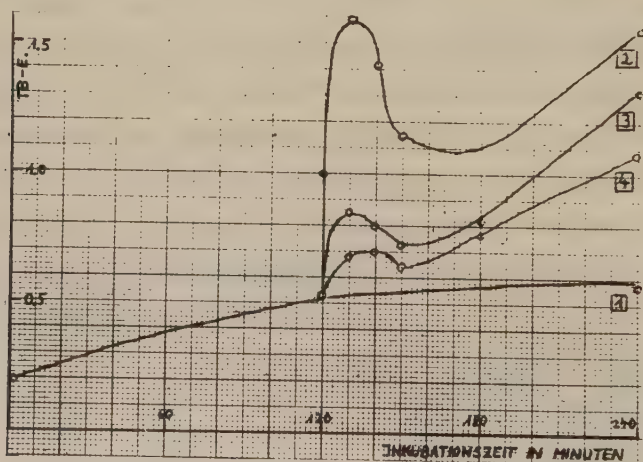


Abb. 19 Ansatz 1: Standardansatz ohne Lipid.
 Ansatz 2: Serin-Kephalin. Ansatz 3: Colamin. Ansatz 4: Lecithin.

Tachostyptan erwies sich als ein Mehrkomplementpräparat, das sowohl die für die Umwandlung von Prothrombin in das Zwischenprodukt erforderlichen Lipidanteile enthält als auch einen

(+)

Für die Überlassung von Serin-Kephalin, Colamin u. Lecithin danken wir Frl. Dr. Debuch (Chem. Phys. Inst., Köln) Lysolecithin verdanken wir der Fa. Nattermann und Sphingosin der Fa. Ciba. Tachostyptan stellte und die Fa. Hormon-Chemie zur Verfügung.

in die Umwandlung von Prothrombin in das Zwischenprodukt eingreifenden Hemmstoff. Die Aktivität des Lipidanteiles entspricht dem Serin-Kephalintyp, die Hemmstoffwirkung entspricht dem Trasylol. Setzt man Tachostyptan zu Beginn der Reaktion zu, dann findet man denselben Effekt wie bei Trasylol, d.h. die Thrombinbildung ist zunächst während einer Latenzzeit von 30 Minuten gehemmt und die anschließend gebildete Thrombinmenge steigt mit zunehmender Tachostyptankonzentration.

Sphingosin und verschiedene Steinamide haben weder einen fördernden noch einen hemmenden Einfluß auf die Reaktion des Prothrombin mit Trypsin.

Lysolecithin, als Lipid zugesetzt, ist wenig aktiv. Bei Reaktionsbeginn zusammen mit Trypsin zugesetzt, hemmt es innerhalb der ersten Stunden den Trypsineffekt, läßt dann aber die beiden Gipfel des alpha- und beta-Thrombin deutlich hervortreten. (Abb. 20)

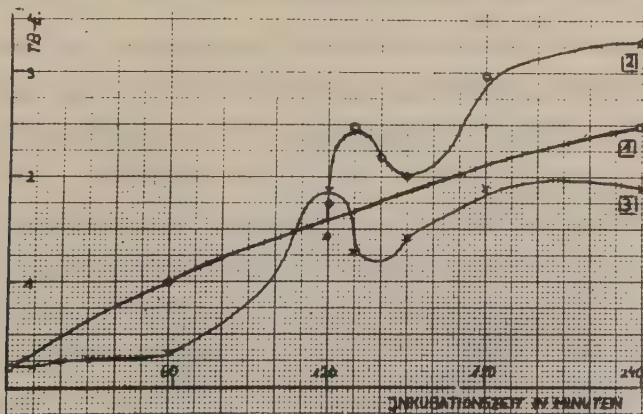


Abb. 20 Lysolecithin als Lipid. Ansatz 1: Standardansatz PTB + Trypsin. Ansatz 2: PTB + Trypsin + Lysolecithin (t_{120}). Ansatz 3: PTB + Trypsin + Lysolecithin (t_0)

9.) Ersatz von Trypsin durch Schlangengifte:

Ob die Spaltung von Prothrombin in Thrombin nur durch Trypsin oder auch durch andere Proteasen erfolgen kann, sollten Versuche zeigen, in denen Trypsin durch verschiedene Schlangengifte ersetzt wurde.

1. Russel Viper Gift (RVV)
2. Reptilase (RP)
3. Vipericin (VP)

Alle drei Schlangengifte wurden in je zwei Konzentrationen geprüft: Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 3 ml enthielten 0.25y bzw. 2.5y, was einer Endkonzentration von 8.33 y% bzw. 83.33 y% entspricht. Wir prüften sie in Gegenwart von Thrombokinaselipid a.) ohne Trypsin und b.) mit Trypsin, wobei wir die Gifte entweder bei Reaktionsbeginn zusetzten oder 60 Minuten nach Start der Reaktion des Prothrombin mit Trypsin. Prinzipiell können alle drei Gifte das Trypsin ersetzen. Der Lipideffekt ist bei allen deutlich, aber es zeigen sich in der Art des entstehenden Thrombin Unterschiede zwischen Russel Viper Gift einerseits und Vipericin andererseits; die Reptilase steht zwischen beiden.

Russel Viper Gift verwandelt bei optimaler Konzentration das Prothrombin nur in Zwischenprodukt I; es entsteht durch Thrombokinaselipid nur alpha-Thrombin. Das Optimum der Thrombinausbeute ist spätestens 20 Minuten nach Lipidzusatz erreicht. Mit Vipericin und Lipid wird beta-Thrombin gebildet, die maximale Thrombinausbeute läßt sich erst nach 60 Minuten nachweisen, ist aber genau so groß wie die bei Russel Viper Gift.

(Abb. 21 und 22)

In Gegenwart von Trypsin wird die Gesamtausbeute nicht nur um

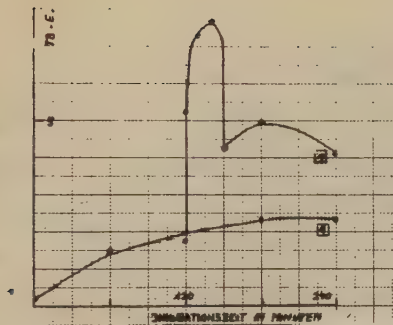


Abb.21 Ansatz 1: PTB +
Russel Viper Venom
Ansatz 2: PTB + RVV
+ Thrombokinaselipid.

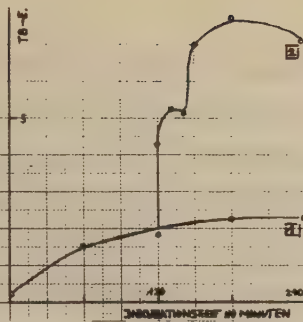


Abb.22 Ansatz 1: PTB + Viper-
icin. Ansatz 2: PTB + VP
+ Thrombokinaselipid.

etwa 20% gesteigert, sondern das Trypsin übernimmt gleichsam die Bildung der Zwischenstufe, zu der das jeweilige Schlangengift nicht fähig ist. (Abb.23 und 24)

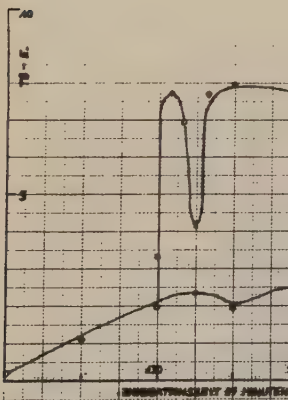


Abb.23 Ansatz 1: PTB + RVV
+ Trypsin. Ansatz 2:
PTB + RVV + Trypsin
+ Thrombokinaselipid

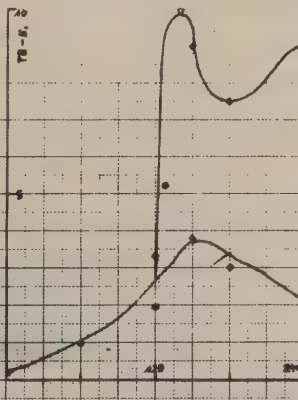


Abb.24 Ansatz 1: PTB + VP +
Trypsin. Ansatz 2: PTB
+ VP + Trypsin + Throm-
bokinaselipid.

10.) Ersatz von Trypsin durch Lysolecithin:

Bei den Kontrollen der Versuche mit Lysolecithin erhielt ich ganz unerwartete Ergebnisse. Wie erwähnt, hemmt es den Trypsineffekt. Setzt man es anstelle von Trypsin ohne Lipid ein und prüft seinen Einfluß auf Prothrombin, so erhält man eine gute Thrombinausbeute in zwei Gipfeln. Lysolecithin wirkt also wie Trypsin plus Lipid. Ein weiterer Lysolecithinzusatz auf der Höhe des ersten Gipfels läßt diesen ganz unverändert, erhöht aber den zweiten auf etwa das Doppelte. Wird vor Anstieg des zweiten Gipfels Thrombokinaselipid zugesetzt, so wird kein Thrombin mehr gebildet, die Ausbeute bleibt auf der Höhe des ersten Gipfels stehen, der sehr viel niedriger liegt als der von beta-Thrombin. (Abb. 25)

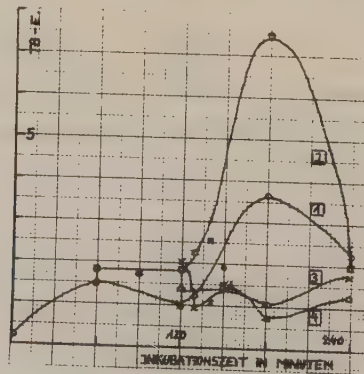


Abb. 25 Lysolecithin statt Trypsin. Ansatz 1: PTB + Lysolecithin (t_0). Ansatz 2: PTB + Lysolecithin (t_0) + Lysolecithin (t_{60}). Ansatz 3: PTB + Lysolecithin (t_0) + Thrombokinaselipid (t_{120}). Ansatz 4: wie Ansatz 2, nach 120 Minuten Zusatz von Thrombokinaselipid.

11.) Einfluß von Aldehydreagentien:

Ich habe versucht, durch Zusatz von Hemmstoffen etwas über die Chemie der Reaktion des Prothrombin mit Trypsin zu erfahren. Die Aldehydreagentien Dimedon und Semicarbazid wurden zu Reaktionsbeginn einem Standardansatz, der Prothrombin und Trypsin enthielt, zugesetzt (Endkonzentration 20 mM/l). Nach 120 Minuten wurde Thrombokinaselipid hinzugefügt.

Beide Stoffe verhindern den Abbau von beta-Thrombin. Normalerweise ist vier Stunden nach Reaktionsbeginn der Gipfel der beta-Thrombinbildung erreicht, und die Aktivität fällt wieder ab. Diese Inaktivierung fehlt bei Zusatz von Dimedon oder Semicarbazid. Dabei ist der Zeitpunkt des Dimedonzusatzes wichtig. Läßt man die Reaktion Prothrombin plus Trypsin in Anwesenheit von Dimedon starten und fügt nach zwei Stunden Thrombokinaselipid hinzu, so verschmelzen die beiden Gipfel des alpha- und beta-Thrombin fast miteinander, die Ausbeute steigt zunächst sehr steil, später etwas langsamer aber kontinuierlich an.

Betrachtet die zeitliche Differenz zwischen Reaktionsbeginn, Dimedonzusatz und der Zugabe von Thrombokinaselipid jeweils 60 Minuten, so wird zwar alpha-Thrombin gebildet, die Ausbeute in den ersten 20 Minuten nach Lipidzusatz liegt aber deutlich niedriger. Nach Abbau dieses alpha-Thrombin steigt der beta-Gipfel sehr schnell und steil an. Werden Dimedon und Thrombokinaselipid zusammen 120 Minuten nach Reaktionsbeginn zugesetzt, so liegt der alpha-Gipfel noch niedriger, und die beta-Thrombinbildung steigt noch steiler und höher an. (Abb. 26)

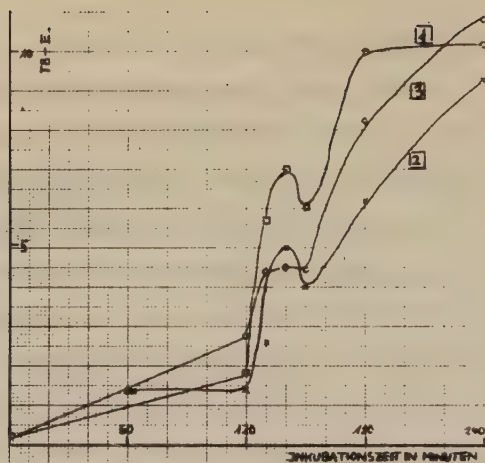


Abb.26 Effekt von Dimedon. Ansatz 1: PTB + Trypsin + Dimedon (t_0) + Thrombokinaselipid (t_{120}). Ansatz 2: PTB + Trypsin + Dimedon (t_{120}) + Thrombokinaselipid (t_{120}). Ansatz 3: PTB + Trypsin + Dimedon (t_{120}) + Thrombokinaselipid (t_{120})

Diese Unterdrückung der alpha-Thrombinaktivität zeigt Semicarbazid nicht so ausgeprägt, während die vermehrte Bildung von beta-Thrombin und die Hemmung seines Abbaues ebenso deutlich sind.

II.

b.) Ersatz von Trypsin durch Plasma und Serum.

1.) Allgemeines:

Die Versuche mit Trypsin führten zu dem Ergebnis, daß die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin drei Komponenten verlangt:

1. ein proteolytisches Ferment,
2. ein Lipoid,
3. Calciumionen.

Ob bei der nativen Thrombokinase ebenfalls diese drei Komponenten zusammenwirken, sollen die folgenden Versuche zeigen. Das Trypsin des Modellversuches wurde durch Plasma, Serum oder durch ein Gemisch beider ersetzt. Normales Plasma enthält bereits einen kleinen Anteil vorgebildeter Thrombokinase. Im Serum könnten nach der Aktivierung der Thrombokinase bei der Spontangerinnung noch aktive Komponenten zurückbleiben. Um Plasma und Serum von gerinnungsaktiven Lipoiden zu befreien, wurden beide gefriergetrocknet und mit Chloroform extrahiert.

Prinzipiell erhält man mit Plasma, Serum oder einem Gemisch von beiden den Trypsinversuchen entsprechende Resultate; das proteolytisch-aktive Prinzip ist also sowohl in Plasma wie in Serum vorhanden. Eine aufeinanderfolgende alpha- und beta-Thrombinbildung läßt sich nicht in solcher Gesetzmäßigkeit und Regelmäßigkeit wie bei den Versuchen mit Trypsin beobachten. (Abb.27)

Genau wie bei Trypsin sind zur Reaktion Calciumionen nötig. Die Abhängigkeit der Thrombinausbeute von verschiedenen Calciumionenkonzentrationen wurde nicht geprüft. In allen Ansätzen lagen Calciumionen in einer Endkonzentration von 9 mM/l vor.

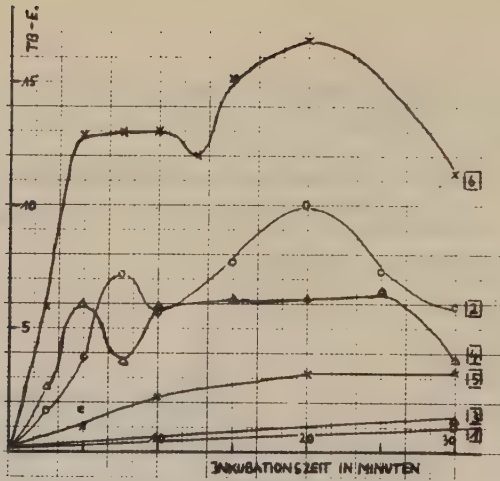


Abb. 27. Ansatz 1: Standardansatz mit PTB, Plasma und Calcium. Ansatz 2: PTB, Plasma, CaCl_2 und Lipid. Die Ansätze 3 und 4 enthalten statt Plasma Serum, während die Ansätze 5 und 6 ein Gemisch von beiden enthalten.

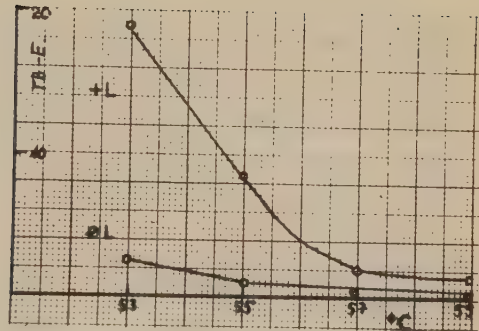
2.) Einfluß von pH und Temperatur:

Plasma als Quelle der proteolytischen Aktivität zeigt ein pH-Optimum bei 7.5

	pH 8.6	7.6	5.9	4.7
Ohne Lipid				
Maximale Ausbeute in TB-Einheiten	0.75	8.75	0.2	0.2
Mit Lipid				
Maximale TB-Ausbeute	2.21	28.8	2.05	1.47

Temperaturen über 53°C inaktivieren die prothrombinspaltende Fähigkeit des Plasmas. (Abb. 28)

Abb.28
Einfluß der Temperatur
auf die maximale Aus-
beute an Thrombin.



3.) Abhängigkeit von Substrat- (PTB-) bzw. Enzym- (Plasma-) Konzentration.

Bei verschiedenen Substrat- und verschiedenen Fermentkonzentrationen ergibt sich ein den Trypsinversuchen durchaus entsprechendes Bild. (Abbildungen 29 bis 31)

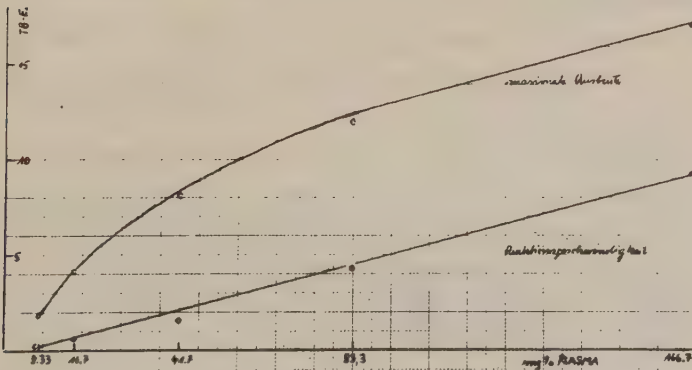


Abb.29 Ausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Plasmakonzentration.

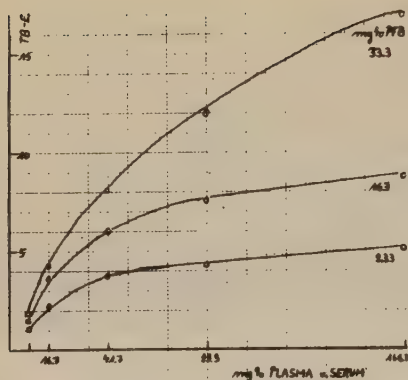


Abb.30
Ausbeute an Thrombin als Funktion der Plasma-Serumkonzentration.

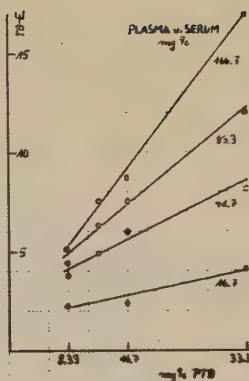


Abb.31
Thrombinausbeute als Funktion der Prothrombinkonzentration.

Thrombinausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit sind also mit und ohne Lipid abhängig von der Plasma- und Serumkonzentration. Das heißt, daß für eine bestimmte Menge Prothrombin eine ganz bestimmte Menge Plasma und Serum notwendig ist. Beide stehen also in einem konstanten Verhältnis zueinander - die Reaktion verläuft stöchiometrisch.

Plasma + Serum	Prothrombin	(Plasma + Serum) : Prothrombin
166.7 mg%	33.3 mg%	5
83.3 mg%	16.7 mg%	5
41.7 mg%	8.33 mg%	5
16.7 mg%	3.33 mg%	5

4.) Inaktivierung durch Vorinkubation mit Serum:

Die proteolytische Aktivität nimmt deutlich ab, wenn man Plasma und Serum längere Zeit bei 37°C vorinkubiert, ehe die eigentliche Reaktion mit Prothrombin und Calcium gestartet wird.

Dieser Befund ist eindeutig bei relativ hohen Plasma- und Serumkonzentrationen, bei sehr niedrigen nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einer Inkubationszeit von 10 Minuten eher etwas zu, während die Ausbeute unverändert bleibt oder etwas abnimmt. (Abb.32)

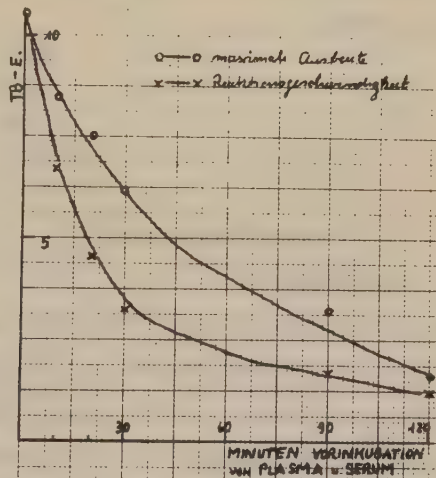


Abb.32
Einfluß einer längeren Vorinkubation von Plasma und Serum auf die Thrombinausbeute und die Reaktionsgeschwindigkeit.

5.) Zusammenfassung:

Die Fermentaktivität von Plasma und Serum entspricht der des Trypsin, d.h. sowohl in Plasma wie in Serum ist diese prothrombinspaltende Komponente enthalten, während sie nach unseren Ergebnissen im Plasma von Kranken mit Haemophilie A oder B fast völlig fehlt. Für die Ausbildung dieser Aktivität sind daher die Faktoren VIII und IX unerlässlich. Der fertig gebildete proteolytische Anteil der Thrombokinasen in Serum oder Plasma benötigt für volle Aktivität keinen Zusatz von Faktor V.

Im Plasma und besonders im Serum ist daneben eine Komponente vorhanden, die bei längerer Inkubation die Fermentaktivität zerstört.

Der Thrombokinasefermentanteil erwies sich als thermolabil, über 55°C geht die Fähigkeit zur Prothrombinspaltung verloren, ebenso oberhalb von pH 8.6 und unterhalb von pH 4.7. Das Ferment läßt sich an Kaolin, nicht dagegen an Bariumsulfat, Aluminiumhydroxyd, Bentonit oder Siliciumdioxid adsorbieren. Hydroxylamin, Natriumborhydrid und Glas setzen die Aktivität etwas herab.

II.

c.) Thrombokinaseferment.

1.) Herstellung:

Ersatz von Trypsin durch Plasma, Serum oder ein Gemisch von beiden bedeutet, daß anstelle eines Fermentes ein sehr heterogenes Gemisch tritt, dessen qualitative und quantitative Zusammensetzung schwer zu definieren ist.

Deshalb wurde versucht, das Ferment anzureichern, und die Darstellung nach folgendem Schema lieferte ein Präparat, das von den übrigen Gerinnungsfaktoren frei war.

Die Asbestfiltration beseitigt Faktor VII und die Lipoidkomponente, und durch BaSO_4 -Adsorption werden Prothrombin und Faktor IX eliminiert. Erhitzen auf 53°C läßt Fibrinogen ausfallen. Nach 5%iger Kaolinadsorption bei pH 5.9 ist der Überstand praktisch frei von Fermentaktivität. Dieses Kaolinsediment wird nach zweimaligem Waschen mit Aqua bidest. mit 0.1%igem Ammoniumcarbonat eluiert und das Eluat gegen Wasser dialysiert. Dabei fällt eine hochaktive Komponente aus, die bei pH 7.8 in 0.9%igem NaCl löslich ist.

Das Ferment ist sehr labil, es verliert in gelöstem Zustand rasch seine Aktivität, ist aber als Trockensubstanz relativ gut haltbar.

	Relative Aktivität
Rinderoxalatplasma:	100 %
Asbestfiltrat:	58 %
3 % BaSO_4 -Überstand:	66 %
53°C für 30 Min., Überstand:	50 %
5 % Kaolin pH 5.9 , Überstand:	3.8%
Kaolinsediment eluiert mit 0.1 % (NH_4) ₂ CO ₃ bei pH 9.6 , dialysiert gegen Wasser, Überstand:	8 %
Niederschlag gelöst in 0.9% NaCl bei pH 7.4 :	32 %
Nach Gefriertrocknen und Extraktion mit Aceton und Chloroform, wiedergelöst in 0.9% NaCl pH 7.4 :	25 %

2.) Allgemeine Eigenschaften:

Die Aktivität dieses Fermentes ,die sehr viel größer ist als die von Plasma und Serum in entsprechenden Konzentrationen, ist wiederum gebunden an die Anwesenheit von Calciumionen. Eine getrennte alpha- und beta-Thrombinbildung, die bei Plasma - Serumgemischen schon sehr viel weniger ausgeprägt ist als bei Trypsin, fehlt bei der Reaktion mit angereichertem Ferment völlig. Das bedeutet, daß nur über Zwischenprodukt I beta-Thrombin entsteht.

Analog den Ergebnissen bei Trypsin wird auch das Thrombokinase - ferment bei seiner Reaktion mit Prothrombin verbraucht, inaktiviert oder abgebunden. Weitere Fermentzusätze lassen die Thrombinausbeute in typischer Weise wieder ansteigen. (Abb.33)

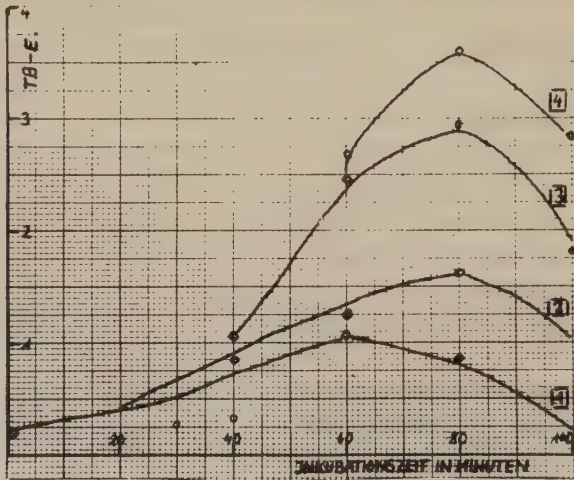


Abb.33 Zusätzliche Fermentzugabe im Abstand von 20 Minuten.

3.) Einfluß der Fermentkonzentration:

Ebenso wie die Fermentmenge das Steigungsmaß der Thrombinbildungskurve bestimmt, sind Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute von der Fermentkonzentration linear abhängig, auch in Gegenwart von Lipid. Das bedeutet, daß der erste Schritt der Thrombinbildung die Reaktion von Prothrombin mit Enzym (Thrombokinaseferment oder Trypsin) ist, und das Lipid kann nur vollenden, was das Ferment vorbereitet hat. (Abb.34)

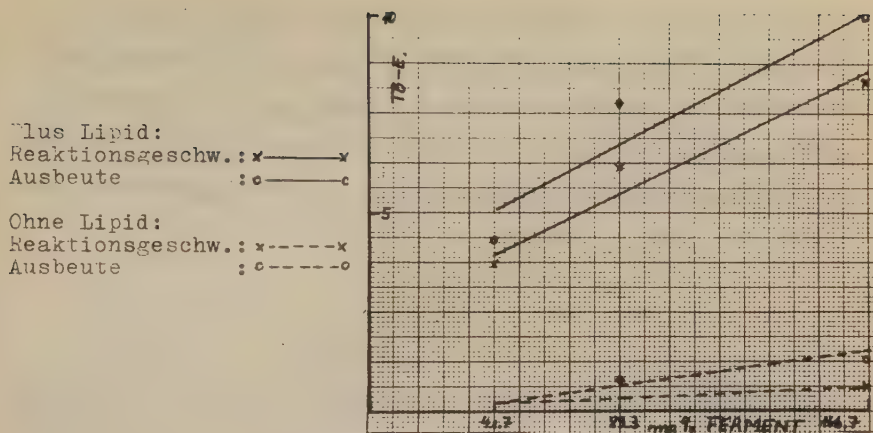
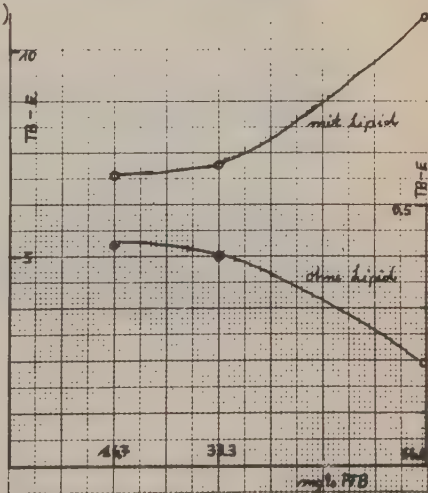


Abb.34 Ausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Fermentkonzentration, ohne und mit Lipid.

Bei konstanter Fermentmenge und wechselnder Prothrombinkonzentration ergeben sich verschiedene Bilder, je nachdem ob im Ansatz Lipid vorhanden ist oder nicht. Ohne Lipid sinkt die Thrombinausbeute mit wachsender Prothrombinkonzentration, während sie in Anwesenheit von Lipid zunimmt. Das spricht wiederum dafür, daß das Ferment immer nur eine ganz bestimmte, zu seiner eigenen Konzentration im Verhältnis stehende Menge Prothrombin umbauen kann. (Abb.35)

Abb.35
Thrombinausbeute in Abhängigkeit von der eingesetzten PTB-Menge, ohne und mit Lipid.

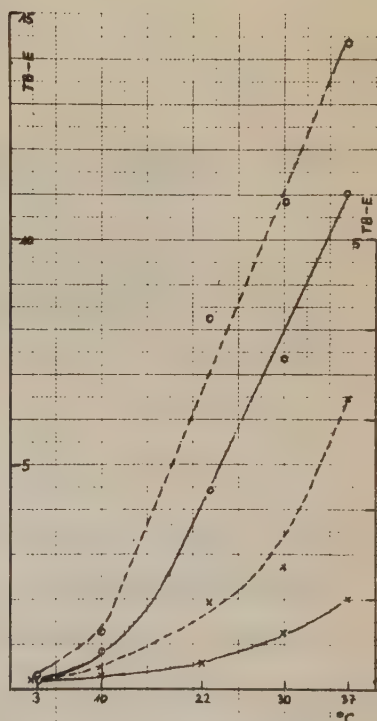


4.) Einfluß der Temperatur und einer Vorinkubation:

Die Aktivierungsenergie errechnet sich aus der Temperaturabhängigkeit. Prothrombin, Calcium, H_2O bzw. Lipid und Ferment werden bei 3° , 10° , 22° , 30° und $37^{\circ}C$ inkubiert, nach 5, 10, 20 und 30 Minuten Proben entnommen und bei $37^{\circ}C$ gegen Vorlageplasma gemessen. (Abb.36)

Ausbeute:
 ohne Lipid ○-----○
 mit Lipid x-----x
 Reaktionsgeschwindigkeit:
 ohne Lipid ●-----●
 mit Lipid x-----x

Abb.36
 Ausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Temperatur.



Daraus errechnet sich eine Aktivierungsenergie von 10.125 cal/Mol ohne Lipid und von 16.200 cal/Mol in Anwesenheit von Lipid.

Vorinkubation des Fermentes mit Prothrombin und Calcium über längere Zeit führt ebenso zu Aktivitätsverlusten wie eine erhöhte Inkubationstemperatur des Versuchsansatzes:

Inkubationstemperatur:

Restaktivität: .

37°C

100 %

53°C

70 %

55°C

35 %

57°C

5 %

59°C

0 %

Inkubiert man dagegen Prothrombin und Ferment bei 37°C und gibt erst nach 10 Minuten Calcium dazu, so wird genau so viel Thrombin gebildet, wie wenn alle Reaktionsteilnehmer bei der Zeit t_0 vorhanden sind, aber die Reaktion läuft sehr viel schneller ab, obwohl bis zur Calciumzugabe keine Thrombinaktivität zu messen ist. (Abb.37)

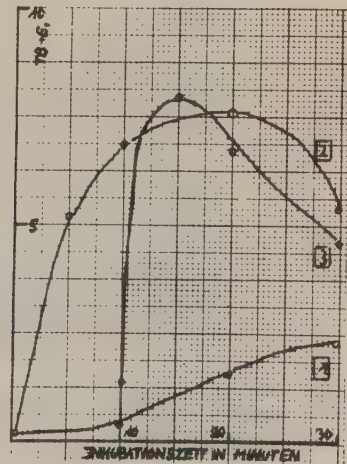


Abb.37

Vorinkubation von Prothrombin und Ferment.

Ansatz 1: Standardansatz mit

PTB, Ferment u. CaCl_2 bei t_0

Ansatz 2: Lipidzugabe bei t_0

Ansatz 3: PTB + Ferment bei t_0 , CaCl_2 + Lipid bei t_{10} .

Daraus möchte ich schließen, daß ohne Calciumionen das Prothrombinmolekül durch das Ferment schon irgendwie verändert wird, zum Beispiel, indem sich ein Prothrombin-Fermentkomplex bildet, und erst in Gegenwart von Calciumionen werden Peptidbindungen gespalten. Es häuft sich eine intermediäre Stufe an, die dann bei Anwesenheit von Lipid und Calcium sehr schnell in Thrombin umgebaut wird. Dieser Befund unterscheidet sich von dem bei Trypsin dadurch, daß bei letzterem Calciumionen von Anfang an anwesend sein müssen. Vielleicht begünstigt das Calcium bei längerer Vorinkubation die spontane Inaktivierung des an sich instabilen Fermentes. Denn wenn man die Reaktion bei der Zeit t_0 mit Calcium startet und erst nach 60 Minuten Lipid hinzufügt, so nehmen Ausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit deutlich ab. (Abb.38)

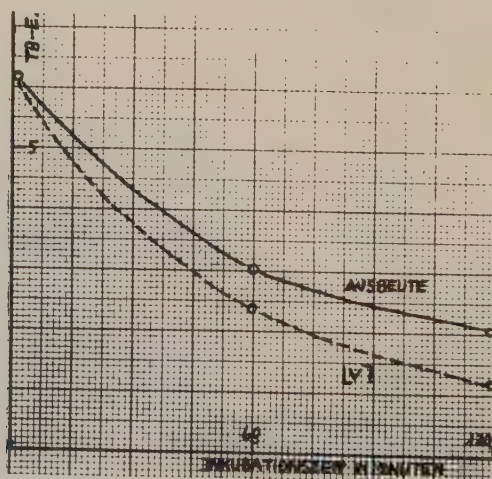


Abb.38 Effekt einer Vorinkubation von PTB, Ferment u. CaCl_2 bis zum Lipidzusatz auf Thrombinausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit.

5.) Hemmstoffe:

Inkubiert man Ferment mit Serum und Calcium vor, so resultiert ein starker Aktivitätsverlust, obwohl Serum alleine schon eine Eigenaktivität besitzt. Auch das spricht dafür, daß im Serum eine fermentabbauende Komponente enthalten ist.

Während Ascorbinsäure und Trasylol keinen Einfluß auf das Ferment haben, verlangsamt Sojabohnentrypsininhibitor SBI die Reaktion in einer Konzentration von 150 y% .

Der Einfluß von Cystein ist nicht sicher zu bestimmen, da Cystein auch in einer Verdünnung von 0.06 Mol als Endkonzentration noch einen deutlich fördernden Einfluß auf die Reaktion des Thrombin mit Fibrinogen hat. Die Thrombinausbeute wird mit Ferment und Calcium in Gegenwart von Cystein um etwa 50 % gesteigert.

Deutlich hemmend wirken Protaminsulfat (1 mg%) und Heparin (0.1 I.E. pro ml) . Thrombin hat keinen Einfluß , und gegenüber Säuren und Laugen ist das Ferment nicht beständig.

6.) Zusammenfassung:

das Ferment läßt sich also folgendermaßen charakterisieren:

1. Löslichkeit: Unlöslich in Wasser, löslich in 0.9 %iger NaCl-Lösung.

2. Adsorptionsfähigkeit: Gut adsorbierbar an Kaolin. Teilweise adsorbierbar an Asbest und Glas. Nicht adsorbierbar an Celit, Bentonit, Siliciumhydroxyd, Bariumsulfat.

3. Stabilität: Sehr gering. Wird zerstört durch Säure, Lauge und Temperaturen von etwa 60°C.

4.Dialyse: Das Ferment passiert nicht die Dialysiermembran.

5.Hemmstoffe: SBI (150 mg%),Protaminsulfat (1 mg%) Heparin (0.1 I.E./ml) und Inkubation mit Serum.

Wie bei kleinen Trypsinmengen erhöht ein Lipidzusatz zu Prothrombin und Ferment Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute sehr stark,bis etwa auf das sechzigfache.

Bei Plasma-Serumgemischen ist der Lipideffekt wohl wegen der geringeren Fermentaktivität nicht ganz so stark.Das angereicherte Enzym ist frei von gerinnungsaktiven Lipoiden,von Prothrombin und Thrombin.Für konstante Fermentmengen ergibt sich im Bereich zwischen 0.33 mg% und 0.017 mg% eine lineare Abhängigkeit von der Lipidkonzentration. (Abb.39)

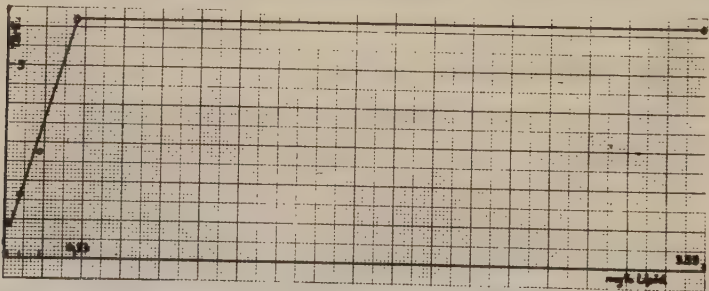


Abb.39 Thrombinausbeute als Funktion der Lipidkonzentration.

MILSTONE fand in seiner Plasmathrombokinase, die er als Zwischenstufe bei der Thrombokinasebildung auffaßt, eine proteolytische Aktivität, die sich durch Spaltung von TAME nachweisen ließ. Das läßt sich für unser Ferment bestätigen, jedoch ist die TAME-Spaltung durch SBI stärker zu hemmen als der Umbau von Prothrombin.

Zusammenfassend kann man folgendes aussagen über die Reaktion



1. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist der Enzymkonzentration direkt proportional.
2. Die Thrombinausbeute ist eine Funktion des zur Verfügung gestellten Prothrombins, sie ist aber außerdem ebenfalls der Enzymkonzentration direkt proportional.
3. Lipid erhöht die Thrombinausbeute um etwa das Sechzigfache.
4. Das Enzym spaltet TAME.
5. Die Reaktion $\text{PTB} \longrightarrow \text{TB}$ wird durch SBI etwas weniger gehemmt als die Spaltung von TAME.
6. Faktor V hat keinen Einfluß auf Reaktionsgeschwindigkeit oder Ausbeute.
7. Die Aktivierungsenergie beträgt $\Delta H = 16.200 \text{ cal/Mol}$.

II.

d.) Zwischenprodukt.

1.) Seine Stellung im Verlauf der Umwandlung des Prothrombin in Thrombin.

Nach unserer Auffassung reagiert das Enzym in Anwesenheit von Calciumionen mit Prothrombin zu einem relativ instabilen Zwischenprodukt, das durch Lipid und Calcium rasch in Thrombin umgewandelt wird, aber auch spontan mit kleiner Ausbeute Thrombin liefert. Dieses Zwischenprodukt ließ sich isolieren. Es ist ein Prothrombinderivat, das keine Thrombinaktivität besitzt und zum Unterschied vom Ausgangsprothrombin ohne Enzym, lediglich durch Lipid und Calcium in Thrombin umgewandelt wird.

2.) Abhängigkeit von der Lipidkonzentration:

Die Abhängigkeit der Thrombinausbeute von der Lipidkonzentration bei der Umwandlung von Zwischenprodukt durch Lipid und Calcium zeigt Abbildung 40 .

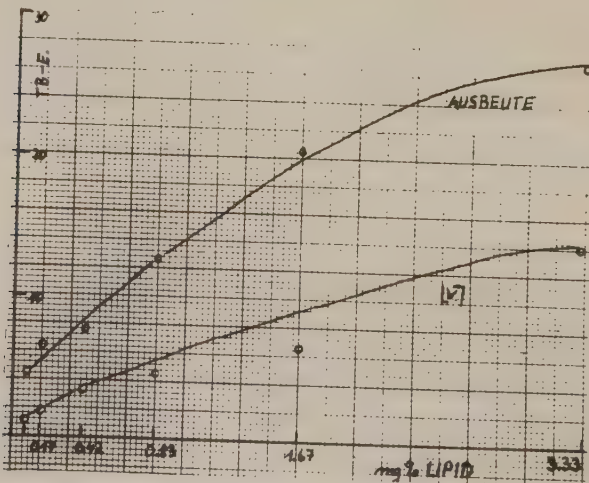


Abb.40 Umwandlung von Zwischenprodukt in Thrombin.
Abhängigkeit von der Lipidkonzentration.

Prothrombin, das nach der Methode von SEEGERs hergestellt ist ⁺), verhält sich wie unser Zwischenprodukt, es muß also bereits den ersten Schritt einer Kettenreaktion durchgemacht haben.

3.) Rolle der Calciumionen:

Die Calciumionen sind für den Umbau der intermediären Stufe in Thrombin unbedingt notwendig. Entfernt man sie durch Ionenaustauscher, so bleibt die Reaktion stehen, und nur ein Wiederhinzufügen von Calcium kann sie wieder in Gang bringen. (Abb.41)

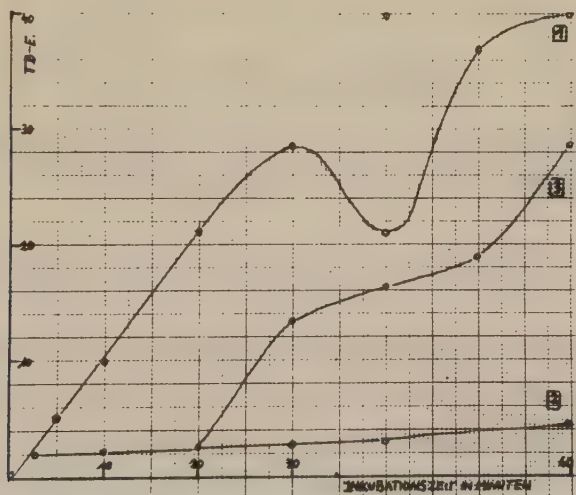


Abb.41 Calciumentzug bei der Reaktion von Zwischenprodukt in Thrombin durch Lipid und Calcium.

Ansatz 1: Zwischenprodukt ("PTB VI") + Lipid + Calcium (t_0)
 Ansatz 2: PTB VI + Lipid + CaCl_2 (t_0) + Ionenaustauscher (t_2)
 Ansatz 3: Wie Ansatz 2, nur nach 20 Min. wieder CaCl_2 -Zugabe.

⁺) Herr Prof. Mammen war so freundlich, uns eine Probe zur Verfügung zu stellen.

Für konstante Konzentration des Lipids und des Zwischenproduktes ("PTB VI") ergibt sich folgende Abhängigkeit von der Calciumionenkonzentration: (Abb.42)

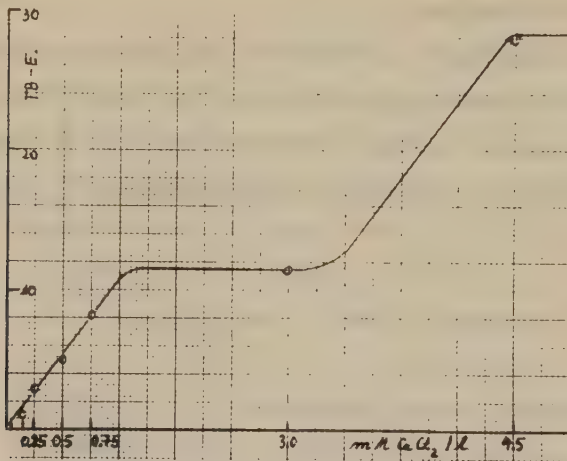


Abb.42 Thrombinausbeute als Funktion der CaCl_2 -Konzentration.

Die Kurve verläuft im Bereich von 0.075 mM/l bis 0.75 mM/l linear, bis 3 mM/l horizontal, um dann bis 4.5 mM/l mit der gleichen Steigung wie anfangs weiterzulaufen. Noch höhere Calciumkonzentrationen können die Thrombinausbeute nicht weiter erhöhen. Eine Erklärung für diesen Befund steht noch aus. Möglicherweise wird bei Calciumkonzentrationen über 3 mM/l ein anderes, spezifisch aktiveres Thrombin gebildet.

4.) Einfluß der Temperatur:

Für die Thrombinausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion des Zwischenproduktes mit Lipid und Calcium ergibt sich

folgende Abhängigkeit von der Temperatur: (Abb.43)

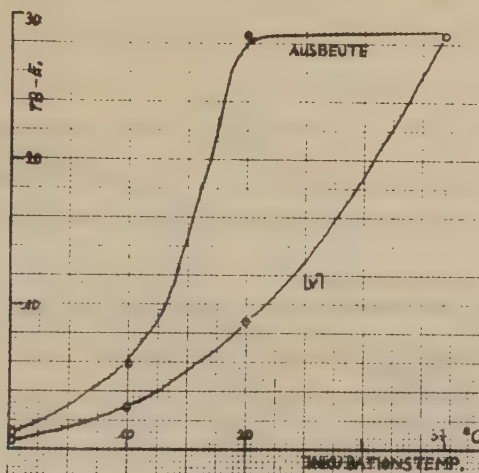


Abb.43 Temperaturabhängigkeit der Reaktion Zwischenprodukt $\longrightarrow$ Thrombin.

5.) Temperatur -und pH-Empfindlichkeit des Zwischenproduktes:
Das Zwischenprodukt ist empfindlich gegenüber pH-Verschiebungen.
Das Ausgangsprothrombin wird durch Säure nicht angegriffen,
während das Ferment inaktiviert wird. Läßt man die Intermediär-
stufe unter Einwirkung einer 0.1 n HCl 30 Minuten stehen, so
verliert sie ihr Charakteristikum, daß sie nämlich ohne Ferment,
nur durch Lipid und Calcium in Thrombin umgewandelt werden kann,
und sie nimmt wieder die Eigenschaften des Ausgangsprothrombin
an: zum Umbau in Thrombin ist jetzt außer Lipid und Calcium
auch Ferment nötig. (Abb.44)

Erwärmen auf 60°C hat das gleiche Ergebnis.

Das Zwischenprodukt zeigt Eigenschaften wie ein Gemisch von
Prothrombin und Ferment. Gegen ein bloßes Gemisch und für einen

Abb.44

Einfluß von Säure und erhöhter Temperatur auf das Zwischenprodukt (PTB VI).

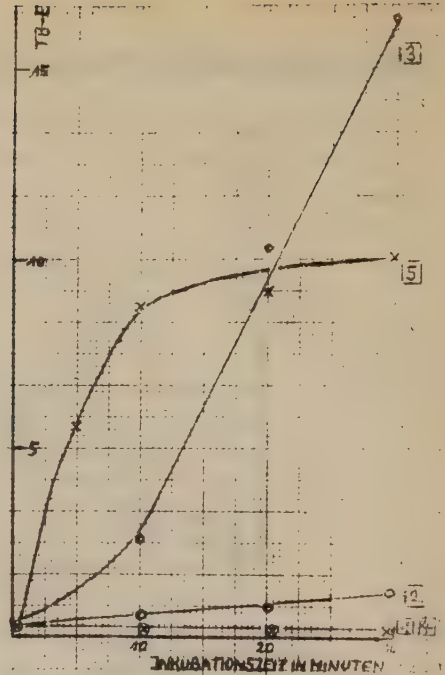
Ansatz 1: PTB VI (säurebehandelt) ohne Ferment + Lipid.

Ansatz 2: PTB VI (säurebehandelt) + Ferment ohne Lipid.

Ansatz 3: PTB VI (säurebehandelt) + Ferment + Lipid.

Ansatz 4: PTB VI (60°C) ohne Ferment + Lipid.

Ansatz 5: PTB VI (60°C) + Ferment + Lipid.



spezifischen Prothrombin-Enzymkomplex sprechen jedoch folgende Befunde: Das Zwischenprodukt läßt sich an Bariumsulfat adsorbieren wie Prothrombin, während das Ferment nicht an diese Substanz adsorbierbar ist.

Säurebehandlung inaktiviert das Zwischenprodukt wie das Ferment, während Prothrombin gegenüber Säure stabil ist.

Die Reaktion von Prothrombin zu Thrombin wird vollständig gehemmt durch Protamin (1 mg%) oder Heparin (0.1 I.E./ml), während die Reaktion von Zwischenprodukt zu Thrombin in Gegenwart von Protamin oder Heparin in diesen Konzentrationen ganz unverändert abläuft. Um diese Reaktion zu hemmen, ist die zwanzigfache Menge des jeweiligen Inhibitors notwendig.

Indem man also den Enzymanteil inaktiviert, wird Prothrombin regeneriert. Protamin oder Heparin greifen in die Bildung dieses

Prothrombin-Enzymkomplexes ein; ist er einmal entstanden, so läuft die weitere Reaktion auch in Gegenwart dieser Inhibitoren ab. Peptidbindungen sind wohl noch nicht gespalten, denn die Reaktion kann noch durch Sojabohnentrypsininhibitor SBI gehemmt werden. Die Aktivierungsenergie errechnet sich aus der Temperaturabhängigkeit zu $\Delta H = 19.300 \text{ cal/mol}$.

Die Eigenschaften des Zwischenproduktes lassen sich also zusammenfassen:

1. Löslichkeit: Löslich in Wasser und in 0.9 %iger NaCl-Lösung.
2. Adsorption: Adsorbierbar an Bariumsulfat.
3. Stabilität: Gefriergetrocknet oder eingefroren stabil bei -20°C für Monate.
4. pH: Labil gegenüber Säuren und Laugen.
5. Temperatur: Durch Erhitzen über 53°C während 30 Minuten wird es in Prothrombin zurückverwandelt.
6. Dialyse: Es passiert nicht die Dialysiermembran.

Über die Kinetik der Reaktion Zwischenprodukt $\longrightarrow$ Thrombin läßt sich folgendes sagen:

1. Benötigt werden Lipid und Calciumionen.
2. Optimaler pH: 7.0
3. Aktivierungsenergie: $\Delta H = 19.300 \text{ cal/mol}$.
4. Hemmstoffe: SBI (150 y%), Protaminsulfat (mehr als 20 mg%),
heparin (mehr als 2.5 I.E./ml)
Keinen Einfluß haben Trasylol, Ascorbinsäure,

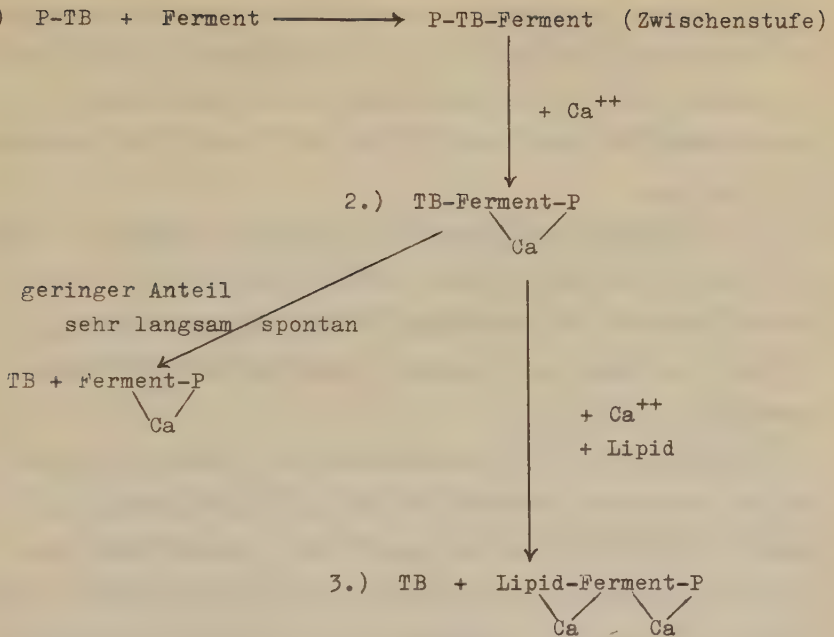
C.) Zusammenfassung.

Andere Aminosäureendgruppen und unterschiedliche Molekülgröße von Prothrombin und Thrombin machen eine proteolytische Spaltung beim Übergang der Enzymvorstufe in das aktive Enzym wahrscheinlich. Die in der Literatur mitgeteilten Befunde unterstützen diese Ansicht. Jedoch kann es sich nicht um eine einfache proteolytische Spaltung handeln, denn die 'Protease' wird wie bei einer stöchiometrischen Reaktion verbraucht. Welcher Vorgang diesem Enzymverbrauch oder, genauer gesagt, dieser Enzyminaktivierung zugrunde liegt, läßt sich aus den durchgeführten Versuchen noch nicht erkennen. Es könnte sein, daß das Enzym mit dem Prothrombinrest oder mit einem abgespaltenen Peptidbruchstück verbunden bleibt.

Als intermediäre Stufe entsteht ein Komplex zwischen Prothrombin und Enzym, der isoliert werden kann. In Gegenwart von Calciumionen erfolgt der Umbau dieses Komplexes, wobei eine geringe Menge Thrombin gebildet wird.

Die eigentliche Spaltung dieses Komplexes unter Freisetzung von Thrombin erfolgt erst, wenn ein Lipoid zugesetzt wird. Dabei wird das Lipid verbraucht. Bei der Spaltung wird das Enzym nicht mehr in seiner aktiven Form zurückgewonnen.

Was seit MORAWITZ als Thrombokinase bezeichnet wird, existiert nach diesen Versuchen nicht als chemisch einheitlicher Wirkstoff. Vielmehr setzt sich die Thrombokinaseaktivität aus einer proteolytischen Komponente und einem Lipoid zusammen. Die Aktivität beider Komponenten ist an das Vorhandensein von Calciumionen gebunden. Der Umbau von Prothrombin in Thrombin erfolgt in einer Reaktionssequenz:



Die proteolytische Komponente lässt sich in Plasma und Serum nachweisen und konnte daraus angereichert und von den bekannten Thrombokinasestufen getrennt werden. Die proteolytische Komponente lässt sich durch Trypsin sowie durch einige Schlangengifte ersetzen.

Lipidaktivität konnte in der chloroformlöslichen, acetonunlöslichen Fraktion aller geprüften Organe nachgewiesen werden. Isoliertes Lecithin, Lysolecithin, Colamin- und Serinkephalin sind ebenfalls aktiv, während Sphingomyelin und Fettsäureamide inaktiv sind.

Interessanterweise scheinen zwei verschiedene aktive Thrombine gebildet zu werden, die, in Anlehnung an die Nomenklatur der Chymotrypsine, als alpha- und beta-Thrombin bezeichnet werden können. Diese beiden Thrombinmoleküle scheinen verschiedene

proteolytische Spaltprodukte darzustellen. Alpha-Thrombin ist sehr unbeständig und geht in eine thrombininaktive Form über. Es entsteht aus dem Zwischenprodukt durch Serinkephalin. Beta-Thrombin entsteht, wenn Trypsin und Lecithin auf Prothrombin einwirken.

Bei allen analogen Reaktionen, bei denen im Verlauf einer Reaktionssequenz biologisch aktive Stufen auftreten, sind diese aktiven Produkte nur kurzlebige Intermediärstufen, die durch weitere Reaktionen zu biologisch nicht aktiven Endprodukten umgewandelt werden.

Das trifft auch für das Thrombin bzw. die Thrombine zu. Über den Teil der Reaktionskette, der für die Inaktivierung von Thrombin verantwortlich ist, fehlen noch systematische Versuche. Die mitgeteilte Beobachtung mit Aldehydreagentien deutet darauf hin, daß mit der Blockierung von Aldehydgruppen Thrombin stabilisiert wird; auf welche Weise läßt sich noch nicht sagen.

Obwohl noch kein ausreichender Einblick in den chemischen Reaktionsablauf der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin möglich ist, haben die vorliegenden Untersuchungen den Weg freigelegt zur weiteren Erforschung der bisher so gut wie unzugänglichen Thrombinaktivierung.

LITERATURVERZEICHNIS

1. P.M.Arscott, J.L.Koppel, J.H.Olwin, *Nature*, Vol.183, 753. (1959)
2. D.E.Bowman, *Proc.exp.biol.med.* 66, 262 (1947)
3. J.A.V.Butler, *Journ.Am.Chem.Soc.*, Vol.LXIII, 1941
4. E.Deutsch, *Arzneim.-Forsch.* 2, 470 (1952)
5. M.Eggstein, R.Gross, *Verhdlg.d.Dtsch.Ges.Inn.Med.* 66. Kongr. (1960)
6. M.B.Glendenning, E.W.Page, *I.Clin.Investig.*, Vol.30 (1951)
7. N.Goosens, A.Walcher, *Zschr.exp.med.*, Bd.129, 171 (1957)
8. E.Hecht, *Thromb.et Diath.Haem.*, Vol.1, Nr.3/4, (1957), 359
9. E.Hecht, *Acta Haematol.*, Vol.9, Nr.4, (1953)
10. E.Hecht, *Thromb.et Diath.Haem.*, Vol.1, Nr.3/4, (1957), 380
11. K.Kato, K.Fukutake, K.Omine, *Tokyo M.C.*
12. G.Kleinfeld, D.V.Habif, *P.S.E.B.M.*, Vol.84, 20670, (1953)
13. H.Eagle, *gen.Phys.* 20, 543, (1936)
14. J.H.Ferguson, *Blood* 3, 1130, (1948)
15. H.Fruhauf, E.Deutsch, *Acta Haematol.*, 13, 161, (1955)
16. J.L.Koppel, D.Mueller, L.Novak, J.L.Olwin, *Am.J.Phys.* No.5, Vol.196
(1959)
17. R.Kuhn, P.Klesse, *Naturwiss.* 12, 352, (1957)
18. C.A.Owen, J.H.Thompson, *Am.J.Clin.Path.*, Vol.33, No.3, 197, (1960)
19. A.J.Quick, *Proc.IV.Internat.Congr.Biochem.*, Wien, 1958
20. L.Róka, *Proc.IV.Internat.Congr.Biochem.*, Vol.X, 195, (1959)
21. L.Róka, *Hoppe Seyler's Ztschr.phys.Chem.* Bd.323, 145, (1961)
22. K.O.Richter, *Zschr. es. Inn.Med.u.Grenzgeb.*, Heft 2, 91, (1955)
23. I.Schulman, *Ann.N.Y.Acad.Scienc.*, Vol.75, 195, (1958)
24. K.H.Slotta, *Soc.Exper.Biol.Med.*, Vol.103, 53, (1960)
25. K.H.Slotta, E.Deutsch, *Thromb.et Diath.Haem.*, Vol.IV, No.2, 283
(1960)
26. K.H.Slotta, *Fed.Proc.* 19, (1959)
27. T.H.Spaet, M.Kropatkin, *Soc.Exp.Biol.Med.*, Vol.95, 492, (1957)
28. H.Zurn, *Arzneim.-Forsch.* 7, 588, (1957)

Lebenslauf

Am 16. Januar 1939 wurde ich in Bad Homburg als zweite Tochter des Arztes Dr. med. Max Walther und seiner Ehefrau Dr. med. Delia, geb. Wilhelmi, geboren. Nach der Volksschulzeit vom Herbst 1946 bis zum Frühjahr 1949 besuchte ich vom April 1949 bis März 1958 das Realgymnasium für Mädchen in Bad Homburg. Nach dem Abitur am 4. März 1958 immatrikulierte ich mich am 21. April 1958 an der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich und schloß diese Zeit nach zwei Semestern im März 1959 mit dem 1. Propädeutischen Examen ab. Ich setzte mein Studium im April 1959 an der Johann Wolfgang Goethe - Universität in Frankfurt / Main fort und legte im Juli 1960 das Physikum ab. Im Herbst 1963 habe ich mit dem Staatsexamen begonnen.

Brigitte Walther

Bad Homburg

21. I. 1964

Meine akademischen Lehrer waren
an der Universität Zürich

Prof. Karrer	im Fach	Chemie
Prof. Voscontini		Chemie
Prof. Hadorn		Zoologie
Prof. Wanner		Botanik
Prof. Dr.med. Töndury		Anatomie

an der Universität Frankfurt / Main

Prof. Dr. med. Starck	im Fach	Anatomie
Prof. Dr. med. Felix		Physiol. Chemie
Prof. Dr. med. Heinz		Physiol. Chemie
Prof. Dr. med. Röka		Physiol. Chemie
Prof. Dr. med. Wezler		Physiologie
Prof. Dr. med. Rotter		Pathologie
Prof. Dr. med. Herzberg		Hygiene
Prof. Dr. med. Holtz		Pharmakologie
Prof. Dr. med. Hoff		Innere Medizin
Prof. Dr. Frey		Innere Medizin
Prof. Dr. med. Heintz		Innere Medizin
Prof. Dr. med. Heinecker		Innere Medizin
Prof. Dr. med. Radenbach		Innere Medizin
Prof. Dr. med. Martin		Innere Medizin
Prof. Dr. med. Jürgens		Innere Medizin
Prof. Dr. med. Geißendörfer		Chirurgie
Prof. Dr. med. Ungeheuer		Chirurgie
Prof. Dr. med. Güntz		Orthopädie
Prof. Dr. med. Käser		Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Prof. Dr. med. Schwenzer		
Prof. Dr. med. de Rudder		Kinderheilkunde
Prof. Dr. med. Weiße		
Prof. Dr. med. Thiel		Augenheilkunde
Privatdozent Dr. med. Otto		Augenheilkunde
Privatdozent Dr. med. Lieb		Augenheilkunde
Prof. Dr. med. Mittermaier		Hals-, Nasen-, Ohren- heilkunde
Prof. Dr. med. Gans		Dermatologie
Prof. Dr. med. Herrmann		Dermatologie
Prof. Dr. med. Zutt		Psychiatrie und Neurologie
Prof. Dr. med. Gerchow		Gerichtliche Medizin
Prof. Dr. Dr. Dr. Artelt		Geschichte der Me- dizin
Prof. Dr. von Reckow		Zahnheilkunde

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

" Über die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin
durch Enzym und Lipid "

im Institut für Vegetative Physiologie unter Leitung von Prof. Dr. med. E. Heinz mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. L. Róka ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Dissertation vorgelegt. Vorliegende Arbeit wird in folgendem Publikationsorgan

Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica
veröffentlicht.

Bad Homburg, den 18. April 1963

Brigitte Walther

Nachwort.

Es ist mir ein Anliegen, nach Abschluß dieser Arbeit

Herrn Prof. Dr. med. Ladislaus Róka

meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen für die
Überlassung des Themas, für die Unterstützung und
Anregung während seiner Bearbeitung und für die
ganze Zeit, die ich bei ihm arbeiten durfte.



